

SÉRIE A, N° 3039

N° D'ORDRE :

3911

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Madeleine KIENY-SENGEL

1^{re} THÈSE. — Contribution à l'étude des besoins nutritifs des tibias embryonnaires d'Oiseau cultivés en milieux naturels et synthétiques.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 18 juin 1957 devant la Commission d'examen.

MM. PRENANT, *Président.*
GALLIEN, {
MAY, } *Examineurs.*

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain, PARIS (VI^e)

1958

SÉRIE A, N° 3039

N° D'ORDRE :

3911

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Madeleine KIENY-SENGEL

1^{re} THÈSE. — Contribution à l'étude des besoins nutritifs des tibias embryonnaires d'Oiseau cultivés en milieux naturels et synthétiques.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 18 juin 1957 devant la Commission d'examen.

MM. PRENANT, *Président.*
GALLIEN, *Examineurs.*
MAY, }



MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain, PARIS (VI^e)

1958

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen J. PÉRÈS.

PROFESSEURS

G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	CUVILLIER	T Géologie structurale et Géologie appliquée.
E. DARMOIS	T Enseign. de Physique.	JUNG	T Pétrographie.
FOCH	T Mécanique physique et expérimentale.	TRILLAT	T Microscopie et diffraction électronique.
PAUTHENIER	T Electrotechnique générale.	WIEMANN	T Chimie org. structurale.
De BROGLIE	T Théories physiques.	JACQUINOT	T Spectroscopie et phy- sique céleste.
JOB	T Chimie générale.	VASSY	Physique de l'atmosph.
PRENANT	T Anat. et Histol. comp.	DESTOUCHES	Théories physiques.
GARNIER	T Géométrie supérieure.	M. PRUVOST	T Géologie.
PÉRÈS	T Mécanique des fluides et applications.	AMIEL	T Chimie (P. C. B.).
LAUGIER	T Physiologie générale.	HOCART	T Minéralogie.
M. CURIE	T Physique (P. C. B.).	J.-P. MATHIEU	T Physique (P. C. B.).
BARRABÉ	T Géologie structurale et géologie appliquée.	COUTEAUX	T Biologie animale (P.C.B.).
G. DARMOIS	T Calcul des probabilités et Physique mathémat.	MAY	T Biologie animale (P.C.B.).
Jacques BOURCART	T Géographie physique et Géologie dynamique.	CHOQUET	T Calcul différent. et intégr.
PLANTEFOL	T Botanique.	FELDMANN	T Biologie (P. C. B.).
GRASSÉ	T Evol. des êtres organisés.	GUINIER	T Physique (P. C. B.).
PRÉVOST	T Chimie organique.	JOST	T Biologie animale (P.C.B.).
BOULIGAND	T Application de l'analyse à la Géométrie.	FORTET	T Calcul des probabilités.
CHAUDRON	T Chimie appliquée.	SCHWARTZ	T Méth. math. de la phys.
WYART	T Minéralogie.	CHOUARD	T Physiologie végétale.
TEISSIER	T Zoologie.	MALAVARD	T Aviation.
MANGENOT	T Biologie végétale.	BRELOT	T Calcul différentiel.
P. AUGER	T Physique quantique et relativité.	NORMANT	T Chimie (P. C. B.).
MONNIER	T Physiol. des fonctions.	BENARD	T Chimie (P. C. B.).
PIVETEAU	T Géologie.	BUVAT	T Botanique (E. N. S.).
ROCARD	T Physique (E. N. S.).	DUGUE	T Statistique mathémat.
H. CARTAN	T Mathématiques (E. N. S.).	GELOSO	T Chimie (S. P. C. N.).
LAFFITTE	T Chimie générale.	SOULAIRAC	T Psychophysiologie.
FAVARD	T Mécanique générale.	ULRICH	T Physiologie végétale.
COULOMB	T Physique du Globe.	MARECHAL	T Optique théorique et appliquée.
Mlle COUSIN	T Biologie animale (P.C.B.).	KIRRMANN	T Théories chimiques.
CHRÉTIEN	T Chimie minérale.	CHADEFAUD	Botanique.
P. DRACH	T Zoologie.	DESTRIAU	Physique (M. P. C.).
KASTLER	T Physique.	Mlle LE BRETON	Physiologie générale.
EPHROSSI	T Génétique.	SALEM	T Mathématiques générales.
WURMSER	T Biol. physico-chimique.	LELONG	T Mathématiques générales.
RIVIÈRE	T Géologie (S. P. C. N.).	DEVILLERS	Anat. et histol. comp.
GAUTHERET	T Biologie végétale (P.C.B.).	EHRESMANN	T Topologie algébrique.
LUCAS	T Recherches physiques.	FRANÇON	Physique (M. P. C.).
A. THOMAS	T Biologie cellulaire.	GLANGEAUD	T Géogr. phys. et géol. dyn.
ARNULF	T Optique appliquée.	GODEMENT	T Mathématiques (M. P. C.).
MAX MORAND	T Physique.	PISOT	T Calcul des probabilités.
SOLEILLET	T Physique.	E. ROCH	Géologie.
FORTIER	T Mécan. expér. des fluides.	SCHATZMANN	Astrophysique.
DANJON	T Astronomie.	TERMIER	T Paléontol. stratigraph.
FROMAGEOT	T Chimie biologique.	ZAMANSKY	T Mathémat. générales.
LAPORTE	T Physique générale et Ra- dioactivité.	JOLIOT	T Phys. nucl. et radioact.
JANET	T Mécanique analytique et Mécanique céleste.	LENNUIER	Physique (P. C. B.).
PETT	T Biologie maritime.	RIZET	Génétique.
QUENEY	T Météorologie et dyna- mique atmosphérique.	Mme TONNELAT	Théories physiques.
GALLIEN	T Embryologie.	DIXMIER	Mathématiques (M. P. C.).
EICHHORN	T Biologie végétale (P.C.B.).	SOUCHAY	Chimie (P. C. B.).
DE CUGNAC	T Biologie végétale (P.C.B.).	AIGRAIN	Physique (P. C. B.).
Mlle CAUCHOIS	T Chimie physique.	BRUSSET	Chimie (P. C. B.).
THELLIER	T Physique du Globe.	M. LÉVY	Physique théorique.
AUDUBERT	T Electrochimie.	LENORMANT	Physiologie.
L'HÉRITIER	T Génétique.	Mme CHAIX	Chimie biologique.
GRIVET	T Radio-Électricité.	Mme HUREL-PY	Biol. végétale (P. C. B.).
PONCIN	T Mécanique des fluides.	PIAUX	Chimie (P. C. B.).
THIRY	T Mécanique appliquée.	BRUN	Mécan. expér. des fluides.
DUBREIL	T Arithmétique et théorie des nombres.	LEDERER	Chimie biologique.
QUELET	T Chimie organique.	Mme DUBREIL- JACOTIN	Mathématiques.
CAIGNARD	T Géophysique appliquée.	Mme LELONG- FERRAND	Mathématiques (E. N. S.).
CHAMPETIER	T Chimie macromolécule.	BELLAIR	Géologie (S. P. C. N.).
		COTTE	T Physique (M. P. C.).
		J. DUBOIS	Chimie.
		LAMOTTE	Zoologie.
		LE ROLLAND	Mécanique des fluides.
		MICHEL	Chimie (P. C. B.).

Secrétaire général CH. MONIER.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES BESOINS NUTRITIFS DES TIBIAS EMBRYONNAIRES D'OISEAU CULTIVÉS EN MILIEUX NATURELS ET SYNTHÉTIQUES

Par MADELEINE KIENY

(Laboratoire d'Embryologie expérimentale du Collège de France
et du C. N. R. S.)

SOMMAIRE

<i>Introduction et position du problème.....</i>	86
I. — Matériel et méthodes.....	87
II. — Croissance et développement « in vitro » des os cartilagineux en milieux naturels	93
A. <i>Milieu standard</i>	93
B. <i>Influence des extraits d'embryons de différents âges sur la croissance du tibia cartilagineux en milieu standard.....</i>	99
C. <i>Remplacement de l'extrait embryonnaire du milieu standard par des liquides organiques adultes.....</i>	102
III. — Essais de remplacement de l'extrait d'embryon par des solutions chimiquement définies	107
A. <i>Milieu T + P, dépourvu d'extrait embryonnaire.....</i>	108
B. <i>Milieu contenant 9 acides aminés, milieu B + P.....</i>	110
C. <i>Milieu synthétique contenant 21 acides aminés, milieu C + P.....</i>	113
D. <i>Mise en évidence d'un facteur de croissance : l'acide para-amino-benzoïque (p-ab)</i>	114
IV. — Besoins nutritifs minimums de la croissance du tibia cartilagineux.	118
A. <i>Elaboration du milieu réduit 60 + p-ab.....</i>	118
B. <i>Essais d'amélioration du milieu de base 60 + p-ab.....</i>	120
C. <i>Mise en évidence du rôle des acides aminés sulphydrilés sur la croissance du tibia.....</i>	127

V. — Action des hydrates de carbone sur la croissance du tibia cartilagineux en milieux synthétiques et naturels.....	134
A. Etude des hexoses.....	134
B. Etude des pentoses.....	141
C. Etude des disaccharides.....	141
D. Etude de diverses substances apparentées aux sucres.....	141
VI. — Etude des facteurs de croissance.....	143
A. Influence des vitamines sur la croissance des tibias cartilagineux cultivés en milieux synthétiques.....	143
B. Essai de remplacement du p-ab par d'autres facteurs de croissance.....	149
VII. — Influence de divers facteurs sur le développement des tibias cultivés en milieux synthétiques.....	153
A. Relation entre l'abaissement du pH du milieu et le nombre de tibias qui se développent sur le milieu.....	153
B. Influence de la saison sur la croissance des tibias cultivés en milieux synthétiques.....	155
Conclusions générales.....	161
Résumé.....	164

INTRODUCTION ET POSITION DU PROBLÈME

Le but des cultures d'organes *in vitro* est de soustraire un organe à l'influence de l'organisme entier et d'étudier son comportement et son développement en l'absence des nombreuses connexions qui le lient aux autres organes ou aux tissus environnants. La culture *in vitro* permet d'étudier l'action de divers facteurs sur l'organe, en éliminant ainsi les influences très complexes de l'organisme dont il provient.

La méthode de culture d'organes d'ET. WOLFF et K. HAFFEN (1952), par sa grande simplicité, présente l'avantage de maintenir la cohésion entre les tissus de l'organe et d'assurer une culture qui respecte l'entité organique, c'est-à-dire une culture « organotypique » (MAXIMOV, 1925). Le seul constituant complexe qui figure dans le milieu standard d'ET. WOLFF et K. HAFFEN est l'extrait d'embryon qu'on peut essayer de remplacer par un mélange de peptides simples et de substances de croissance de composition chimique définie. Grâce à cette substitution, on peut évaluer les besoins nutritifs des organes embryonnaires pendant une certaine période du développement.

L'étude des besoins nutritifs généraux et spéciaux du tibia cartilagineux de l'embryon de Poulet cultivé en milieux synthétiques m'a été confiée par mon maître, le P^r ET. WOLFF. En même temps, EM. WOLFF et K. STENGER-HAFFEN ont poursuivi des recherches parallèles respecti-

vement sur la syrinx et sur les gonades des embryons de Canard et de Poulet.

Ce travail en équipe présente l'avantage d'établir, d'une part, les besoins nutritifs qui sont communs aux trois organes, d'autre part, de souligner les caractères distinctifs de ces organes par la mise en évidence de leurs exigences différentes. Il est intéressant de montrer que le tibia différencié histologiquement au moment de l'explantation nécessite pour sa croissance des substances différentes de celles qui sont favorables à la syrinx ou aux gonades, organes destinés à franchir, *in vitro*, le seuil de leur différenciation histologique et sexuelle.

A la date où commencèrent nos recherches (ET. WOLFF, 1953; ET. WOLFF, K. HOFFEN, M. KIENY, EM. WOLFF, 1953), des cultures d'organes en milieux synthétiques n'avaient pas encore été entreprises dans d'autres laboratoires.

Mettant à profit les principes de la méthode de culture d'organes en milieux synthétiques, LEPORI (1953) et SENDEL (1955), dans notre laboratoire, ont étudié *in vitro* la croissance et la pigmentation des germes plumaires de la peau de l'embryon de Poulet.

En 1955, TROWELL a employé, à son tour, une méthode de culture voisine de la nôtre, qui lui permet de cultiver organotypiquement des ganglions lymphatiques en milieux synthétiques.

C'est une grande joie pour moi de remercier ici mon maître, le P^r ETIENNE WOLFF. Entrée inexpérimentée dans son laboratoire, j'y appris, jour après jour, à ses côtés, les multiples techniques de l'embryologie expérimentale. Grâce aux nombreux conseils dont il sut enrichir chacun de nos fréquents entretiens, je me familiarisai peu à peu avec les précieuses méthodes de la recherche scientifique. Le climat d'enthousiasme et de confiance qu'il fait régner dans son entourage, les encouragements qu'il me prodiguait dès que mes recherches semblaient s'alanguir, sa sollicitude de tous les instants, ne sont pas les moindres raisons de l'aboutissement de mon travail. Pour tout cela et pour tous les enseignements qu'il me donna et que je ne puis énumérer, je tiens à lui témoigner ma profonde reconnaissance.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

Toutes les recherches sur les besoins nutritifs des tibias cartilagineux en culture *in vitro* sont faites sur l'embryon de Poulet de race Leghorn blanche. Les œufs proviennent de la région de Haguenau (Bas-Rhin).

Les tibias sont prélevés au 8^e jour d'incubation, aux stades 30 à 32 de HAMBURGER et HAMILTON (1951).

A. — MÉTHODE DE CULTURE « IN VITRO » EN MILIEUX NATURELS

Nous avons utilisé la méthode de culture mise au point par ET. WOLFF et K. HOFFEN (1952).

La composition des milieux est la suivante :

1. — *Milieu « standard ».*

Gélose à 1 % dans du liquide de Gey.....	7 gouttes
Extrait embryonnaire dilué de moitié dans du liquide de Tyrode	3 »
Liquide de Tyrode (1)	3 »

L'extrait embryonnaire est toujours préparé à partir d'embryons de la race Leghorn blanche.

2. — *Milieu EE + SS ou milieu EE + PP.*

Gélose à 1 % dans du liquide de Gey	7 gouttes
Extrait embryonnaire (EE) dilué de moitié dans du liquide de Tyrode	2 »
Sérum de Cheval (SS) ou plasma de Poulet (2) (PP)....	1 »
Liquide de Tyrode	3 »

B. — MÉTHODE DE CULTURE « IN VITRO » EN MILIEUX SYNTHÉTIQUES

La méthode de culture en milieux synthétiques n'est qu'une variante de la méthode mise au point par ET. WOLFF et K. HAFFEN, en ce sens que l'extrait embryonnaire est remplacé par une solution chimiquement définie pouvant contenir sels, sucres, acides aminés et vitamines (ET. WOLFF, 1953; ET. WOLFF, K. HAFFEN, M. KIENY et EM. WOLFF, 1953).

1. — *Composition des milieux synthétiques.*

Nous appelons *milieu T* le milieu entièrement dépourvu de substances quaternaires et constitué par le substratum de base et par le liquide physiologique glucosé de Tyrode. La composition du milieu T est la suivante :

Gélose à 1 % dans du liquide de Gey.....	9 gouttes
Liquide de Tyrode	6 »

Les milieux synthétiques plus complexes sont préparés de la manière suivante:

Gélose à 1 % dans du liquide de Gey.....	9 gouttes
Solution d'acides aminés et de vitamines dans du liquide de Tyrode	6 »

2. — *Préparation des différentes solutions
servant à la confection des milieux synthétiques.*

a) *Solution de gélose.* — 10 g d'agar (2) sont dissous dans 1 litre de liquide de Gey (3).

(1) Au début de nos expériences, nous mettions une goutte de spéicilline-subtosan (200 000 unités Oxford de sel de Na de pénicilline G pour 10 cm³ de polyvinyl-pyrrolidone) dans chaque milieu. Pour des raisons que nous expliquerons dans le chapitre III, nous mettons directement 3 gouttes de la solution de pénicilline dépourvue de novocaïne dans 50 cm³ de liquide de Tyrode qui entre dans la composition des milieux. Ainsi chaque milieu synthétique ou naturel contient environ 10 Unités Oxford de sel de Na de pénicilline G. Cette dose est inactive au point de vue nutritif (GOOSSENS, 1954).

(2) Nous employons les produits provenant des laboratoires Difco (Detroit, Michigan).

(3) Les sels et le glucose proviennent des laboratoires Merck (Darmstadt).

b) *Liquide de Tyrode*. — Nous préparons le liquide de Tyrode d'après CAMERON (1950) : nous introduisons la quantité de sels (1) correspondant à la composition de 1 litre de Tyrode dans 1 100 cm³ au lieu de 1 000 cm³. La stérilisation ramène à environ 1 litre le volume du liquide. Un milieu légèrement hypotonique ne nuit d'ailleurs pas aux cultures.

c) *Solution synthétique à base d'acides aminés*. — La première solution qui a été éprouvée en collaboration avec ET. WOLFF, K. STENGER-HAFFEN et EM. WOLFF (1953) est voisine de celle de BERGMANN et NIEMANN, déjà utilisée par FISCHER (1941) et par JENSEN (1948). Nous avons remplacé la cystine du mélange de BERGMANN et NIEMANN par une quantité égale de cystéine. Cette solution, que nous dénommons « solution B », est utilisée pour la culture du tibia à la concentration 1/10.

Voici la constitution de la solution B/10 :

L (+) lysine 2 HCl	6,04 mg
L (+) arginine base	3,08 »
DL-méthionine	1,04 »
DL-histidine HCl	1,24 »
acide L (+) glutamique	5,64 »
acide DL aspartique	2,36 »
L (—) proline	2,04 »
L (—) cystéine HCl	0,60 »
L (—) tryptophane	2,00 »

dans 100 cm³ de liquide de Tyrode.

Une autre solution, « solution C », groupe la plupart des acides aminés, qui ont été employés dans les milieux de MORGAN, MORTON et PARKER (1950), de WHITE (1946), de WAYMOUTH (1951), ou qui ont été reconnus par EARLE (1952) dans l'ultrafiltrat de sérum et de l'extrait embryonnaire ou encore qui sont indispensables à la croissance des organismes d'après ROSE (1938). Cette solution C, également employée pour le tibia à la concentration 1/10, a la composition suivante :

L (+) lysine 2 HCl	6,04 mg
L (+) arginine base	3,08 »
DL-méthionine	1,04 »
DL-histidine HCl	1,24 »
acide L (+) glutamique	5,64 »
acide DL aspartique	2,36 »
L (—) proline	2,04 »
L (—) cystéine HCl	0,60 »
L (—) tryptophane	2,00 »
DL-phénylalanine	2,80 »
L (—) leucine	3,60 »
DL-isoleucine	4,00 »
DL-thréonine	4,80 »
DL-valine	5,60 »
glycine	1,00 »
L (—) tyrosine	0,40 »
L (—) hydroxyproline	1,00 »
taurine	2,00 »
ornithine 2 HCl	2,00 »
DL-sérine	5,00 »
L (—) asparagine	2,00 »

dans 100 cm³ de liquide de Tyrode.

(1) Le phosphate de Na nous a été fourni par Prolabo; les autres sels et le glucose proviennent des laboratoires Merck (Darmstadt).

Les solutions d'acides aminés sont préparées dans 50 cm³ de liquide de Tyrode hypotonique de la manière suivante : 50 cm³ d'eau bidistillée sont divisés en trois parties, dont la première, de 7 cm³, reçoit le bicarbonate de Na; la deuxième, de 34,4 cm³, les autres sels du liquide de Tyrode et le glucose; la troisième de 8,6 cm³, les acides aminés. Les trois solutions sont stérilisées séparément à l'autoclave. On évite ainsi de stériliser les acides aminés en présence des sels et du glucose.

Au moment de la préparation des milieux, les trois solutions sont réunies dans le flacon qui contient les acides aminés.

d) *Solutions synthétiques contenant des acides aminés et des vitamines* (1). — Les solutions contenant des vitamines sont préparées, comme les solutions synthétiques, dans 50 cm³ de liquide de Tyrode, mais en divisant, cette fois, les 50 cm³ d'eau bidistillée en 4 portions, dont la première, de 7 cm³, reçoit le bicarbonate de Na; la deuxième, de 34,4 cm³, les autres sels du liquide de Tyrode et le glucose; la troisième, de 7,6 cm³, les acides aminés, et dont la quatrième, de 1 cm³, est prélevée dans une solution mère de vitamine dans l'eau bidistillée dont la concentration varie de 1 mg à 0,001 mg/litre, selon la concentration finale désirée.

Les solutions mères de vitamines ne sont pas stérilisées, mais les vitamines sont pesées stérilement et dissoutes dans de l'eau bidistillée stérile. Les quatre solutions sont réunies, au moment de la préparation des milieux, dans le flacon contenant les acides aminés.

Dans le cas des vitamines liposolubles, la dilution s'effectue, d'après MORGAN, MORTON et PARKER (1950), par l'intermédiaire d'alcool à 95° et d'une solution aqueuse à 5 % de Tween 80, pour aboutir à des solutions mères contenant de 40 000 à 0,04 U. I. de vitamine D et de 300 000 à 0,03 U. I. de vitamine A par litre.

e) *Substance adjuvante*. — Nous avons utilisé, pour des raisons qui seront exposées dans le chapitre III, une solution d'acide para-aminobenzoïque que nous avons ajoutée aux milieux synthétiques, à raison d'une goutte par milieu. Cette substance a été utilisée, sous forme de sel de Na de p-ab, ou sous forme d'acide, en solution aqueuse à la concentration 1/10³. Le milieu 60 + p-ab, qui est un milieu de base, est préparé ainsi :

Gélose à 1 % dans du liquide Gey	9 gouttes
Solution d'acides aminés n° 60 dans du liquide de Tyrode	6 »
Solution de p-ab dans l'eau bidistillée stérile.....	1 »

f) *Modifications de la préparation des différentes solutions pour l'étude des hydrates de carbone*. — Pour étudier l'utilisation des hydrates de carbone en culture *in vitro*, nous nous sommes servis d'une solution de gélose à 1 % dans du liquide de Gey non-glucosé. Nous avons supprimé le glucose dans le liquide de Tyrode et nous l'avons remplacé par l'un des sucres à éprouver.

Les concentrations des hexoses varient de 0,2 g/litre à 20 g/litre. Les pentoses, les disaccharides et les substances apparentées aux hydrates de carbone sont utilisés à des concentrations moléculaires égales à celles des hexoses.

(1) Les acides aminés et les vitamines nous ont été fournis par les Etablissements Hoffmann-La Roche.

3. — *Préparation des milieux.*

Les milieux sont préparés dans des godets à micrographie, du type « salière », à cavité hémisphérique de 5 cm³, déjà préconisés par GAILLARD (1949). Un couvercle de verre s'adapte exactement à la surface supérieure polie du récipient.

On mélange intimement les différents ingrédients selon le procédé décrit par ET. WOLFF et K. HAFEN (1952). On obtient une gelée claire, élastique et parfaitement homogène.

4. — *Etude du pH.*

Les mesures de pH sont effectuées à l'aide du pH mètre Heito. Nous employons une électrode adaptée aux mesures de pH par contact de petites quantités de matériel. L'évaluation du pH d'un milieu se fait de la manière suivante :

1° mesures du pH sous l'organe ou sous les organes;

2° 3 mesures de pH dans le milieu environnant;

d'où le pH du milieu = moyenne de 4 à 6 mesures.

La salière est maintenue à 38° jusqu'au moment des mesures, car on sait que le pH varie en fonction de la température.

5. — *Culture proprement dite.*

L'ébauche cartilagineuse est disséquée sous le stéréo-microscope Zeiss-Opton. L'organe est soigneusement débarrassé des tissus conjonctifs qui l'entourent et déposé sur un milieu de culture provisoire qui, dans des séries où figurent plusieurs catégories de milieux synthétiques, est toujours le milieu le moins nutritif. Le tibia est ensuite repris, pour être pesé stérilement. On le dépose, enfin, sur le milieu de culture définitif en ayant soin de ne pas écorcher la surface du gel. La « salière » est soigneusement lutée à la paraffine et incubée à la température de 38°.

Pendant toute la durée de la culture, les explants ne subissent ni lavage ni repiquage.

Quelques tibias ont donné lieu à des dessins à la chambre claire.

C. — MESURES DE CROISSANCE

1. — *Croissance linéaire.*

Les tibias sont mesurés au moment de l'explantation, quotidiennement pendant la culture et en fin d'expérience. On utilise un micromètre Zeiss gradué à 0,1 mm.

Calcul d'erreur. — L'erreur absolue « ρ » a été établie, une fois pour toutes, en choisissant pour intervalle de confiance τ fois l'écart quadratique moyen d'une série de n mesures a_i , de moyenne arithmétique m :

$$\rho = \tau \sqrt{\frac{\sum (a_i - m)^2}{n - 1}}$$

où $n = 20$ (nous avons mesuré un même tibia, au moment de l'explantation, 20 fois de suite),

et où τ est la valeur de la statistique t de Student-Fischer pour une probabilité de 0,05 et $(n-1)$ degrés de liberté ($\tau = 2,093$).

On trouve ainsi $\rho = \pm 0,05$ mm.

2. — Croissance pondérale.

Les tibias sont pesés par trois (1), à l'aide d'une balance de torsion graduée à 0,2 mg et permettant d'apprécier facilement 0,1 mg, au début et à la fin de la culture. Avant d'être posés sur la nacelle d'étain, les tibias sont soigneusement épongés, pour éviter, dans la mesure du possible, un trop grand transport d'eau. En outre, les pesées sont faites aussi rapidement que possible, ce qui limite au minimum l'évaporation de l'eau; il est permis de penser que l'erreur due à l'évaporation est sensiblement invariable.

Calcul d'erreur. — L'erreur absolue « ρ » sur une pesée a été calculée selon la formule donnée plus haut. Nous avons pesé 20 fois de suite, avec 20 nacelles de poids différents, un objet sec et inerte pesant environ 3,7 mg (poids voisin de 3 tibias de 7-7 1/2 jours). Il n'était pas possible d'effectuer ces 20 mesures sur les tibias eux-mêmes, car ceux-ci eussent été exposés à la dessiccation pendant le temps que durent ces 20 pesées; la perte d'eau eût introduit des erreurs supplémentaires, qui ne sont pas commises lors des pesées normales des tibias avant et après la culture.

On obtient pour 3 tibias, $\rho = \pm 0,1$ mg.

3. — Croissance azotée.

Le dosage de l'azote total des tibias est effectué selon l'ultramicrométhode de Kjeldahl, adaptée par VENDRELY (1947).

Une paire de tibias d'un même embryon fournit à chaque dosage deux organes aussi semblables que possible, dont l'un est explanté et l'autre sert de témoin de départ. Un dosage comprend de 3 à 4 tibias.

Calcul d'erreur. — Nous avons calculé que l'erreur absolue sur la variation de la teneur en azote total des organes en culture, *in vitro*, est de l'ordre de ± 2 à 3 %. Nous nous accordons une marge de ± 5 %; il n'est pas tenu compte d'un gain ou d'une perte d'azote inférieurs ou égaux à 5 %.

D. — MÉTHODE HISTOLOGIQUE

Les ébauches sont fixées au liquide de Bouin ou au Zenker acétique. Les coupes sont faites longitudinalement à 5μ d'épaisseur, et colorées à l'hématoxyline, à la fuchsine et au bleu d'aniline selon la méthode trichromique de Masson.

(1) Les tibias sont pesés par trois pour deux raisons: il se trouve (chapitre VII) que les résultats de croissance sont meilleurs lorsque l'on cultive 3 tibias sur un milieu au lieu d'un seul tibia; par ailleurs, l'erreur absolue commise sur le poids d'un tibia est 3 fois moindre que celle commise sur la pesée.

II. — CROISSANCE ET DÉVELOPPEMENT
 « IN VITRO »
 DES OS CARTILAGINEUX EN MILIEUX NATURELS

A. — MILIEU STANDARD

Des tibias d'embryons de Poulet sont prélevés au 8^e jour d'incubation, aux stades 30-32 de HAMBURGER et HAMILTON (1951). Au moment de l'explantation, ils se présentent sous forme de baguettes cartilagineuses dont les épiphyses sont à peine renflées. Certains d'entre eux présentent une indication du futur manchon osseux.

1. — Développement anatomique.

Explantés sur le milieu standard (ET. WOLFF et K. HAFEN, 1952) à base de jus d'embryons âgés de 7 à 12 jours, les tibias s'allongent et poursuivent leur morphogénèse. La durée de culture est de 7 jours.

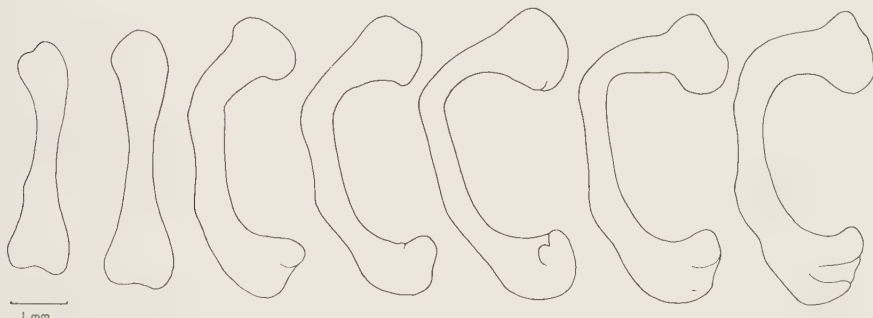


FIG. 1. — Evolution d'un tibia d'embryon de Poulet de 7 jours, cultivé pendant 7 jours sur milieu standard d'ET. WOLFF et K. HAFEN. Dessins à la chambre claire effectués au moment du prélèvement, les 2^e, 3^e, 4^e, 5^e et 7^e jours de culture. Croissance linéaire : 4,0 à 6,5 mm.

Les tibias, qui, au moment de l'explantation, présentent encore quelques petites plaques de tissus conjonctifs blanchâtres, aplanissent leur surface, deviennent translucides et brillants. Ils ferment bientôt leurs petites blessures et s'entourent complètement d'une fine membrane probablement de nature conjonctive. Cette « épithélisation », déjà remarquée par GAILLARD (1949) et WILDE (1950), et surtout mise en lumière par ET. WOLFF (1952), est une condition indispensable à la réussite de l'expérience. En effet, si l'épithélisation, pour des raisons connues ou inconnues, ne se réalise pas,

les bords de l'explant s'effritent, le tibia s'opacifie progressivement, la nécrose s'installe et au bout de 48 heures l'explant périlite.

La diaphyse s'allonge, les épiphyses se renflent et se façonnent. Après 2 à 3 jours de culture, le manchon osseux devient plus apparent. Après 7 jours, la partie médiane de la diaphyse s'est peu élargie, alors que le diamètre des régions épiphysaires a augmenté dans de fortes proportions (fig. 1).

Le tibia présente alors, très souvent, une manière de constriction qui

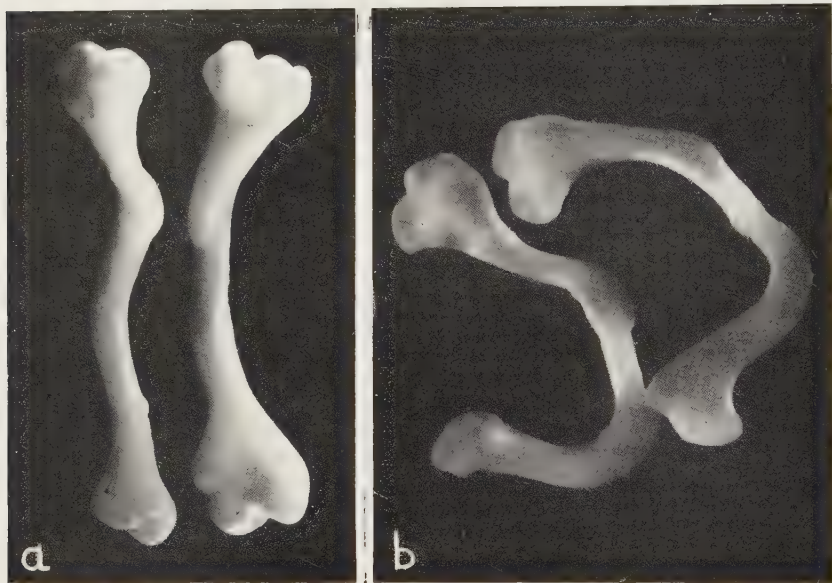


FIG. 2. — Tibias d'embryons de Poulet de 7 jours, cultivés pendant 7 jours sur milieu standard. Noter la coudure très importante sur la figure *b*. Photographies prises après fixation au liquide de Bouin. (Gr. : $\times 9$ pour la figure *a* et 9,5 pour *b*.)

le sangle dans sa partie médiane. Cette ceinture correspond en étendue au manchon qui, à peu de chose près, conserve les dimensions qu'il avait au moment de l'explantation.

Comme dans le développement normal, les 2 condyles et la gouttière du muscle extenseur des doigts se dessinent à l'extrémité distale du tibio-tarse. La crête tibiale antérieure, qui part de l'extrémité proximale, apparaît très rarement. Mais l'apophyse cnémiale (HUXLEY, 1873) se différencie dans tous les cas où l'épiphyse a été conservée intacte au moment du prélèvement (fig. 2).

L'allongement se traduit souvent par une coudure et une distorsion du tibia. Les épiphyses, ancrées dans le milieu, ne peuvent glisser à sa sur-

face, et le tibia s'allonge en s'arquant sur ses extrémités. La courbure, bien qu'anormale, est un signe de bonne croissance et elle est d'autant plus accentuée que l'allongement est plus grand. Les dessins à la chambre claire illustrent très bien les mouvements qui se réalisent au cours de la culture. Ils montrent également qu'une petite lésion se cicatrise progressivement (fig. 3). Il n'en est pas de même d'une lésion importante. Dans ce cas, le tibia est incapable de réparer les dégâts. Privé, par exemple, de la région articulaire de l'une de ses épiphyses, le tibia se cicatrise au niveau de la section, sans qu'il y apparaisse de différenciations morphologiques. Ce résultat démontre qu'à ce stade l'explant n'est plus capable de régulation.

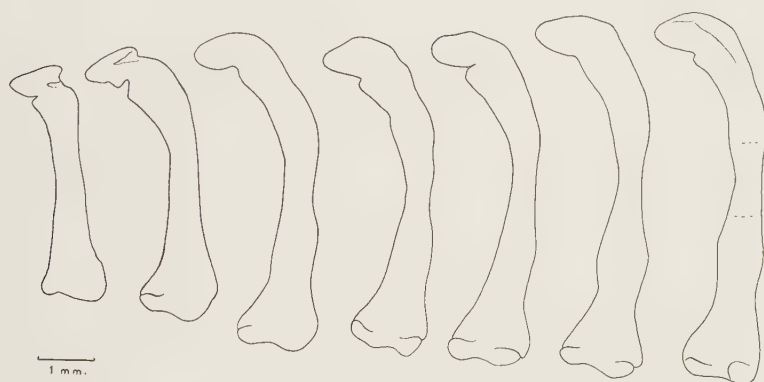


FIG. 3. — Evolution d'un tibia d'embryon de Poulet de 7 jours, cultivé pendant 7 jours sur milieu standard. La petite lésion, provoquée à l'épiphyse proximale au moment du prélèvement, se cicatrise progressivement. Cette épiphyse n'est pas capable de réparer les dégâts d'une lésion importante.

2. — Croissances linéaire, pondérale et azotée.

La croissance linéaire et l'augmentation pondérale des tibias sont étudiées sur un lot de 26 tibias.

Les tibias s'allongent en moyenne de 4,45 mm à 7,0 mm, soit de 58 %. La vitesse de croissance est maximum pendant les deux premiers jours de culture, puis elle diminue et la croissance s'arrête presque complètement le 8^e jour de culture. Les explants ne sont ni lavés ni repiqués au cours des 7 jours de culture.

L'augmentation pondérale, mesurée à l'aide d'une microbalance de torsion qui permet d'évaluer le 1/10 de mg, est de 80 %. Le poids des tibias passe en moyenne de 1,5 à 2,7 mg.

Les résultats des dosages de l'azote total des tibias après 7 jours de culture, selon l'ultra-microméthode de Kjeldahl, montrent que l'augmentation pondérale est due principalement à des synthèses protéiques, au

sein de l'explant. L'enrichissement en azote est de 41 à 51 % après 3 jours, de 44 % après 5 jours et de 55 à 91 % après 7 jours de culture (tableau I). Ces résultats ont été obtenus en utilisant de l'extrait embryonnaire de 10 à 13 jours.

TABLEAU I
RÉSULTATS DES DOSAGES D'AZOTE AVANT ET APRÈS L'EXPLANTATION

Milieu étudié	Stade en jours	Nombre d'organes par essai	Durée de la culture en jours	Teneur en N total en γ par tibia		Augmentation en %
				Avant l'explantation	Après l'explantation	
Standard.	7	4	7 jours.	6,8	10,5	55
»	—	—	—	5,8	9,6	65
»	—	—	—	7,4	14,1	91
»	—	—	—	6,1	9,7	59
»	—	—	5	7,5	10,9	44
»	—	—	3	9,1	12,8	41
»	—	3	3	9,3	14,0	51

Erreur maximum :
5 %

Il faut noter que ces accroissements linéaire, pondéral et azoté, ne représentent pas les accroissements optimums que permet la méthode. On pourrait, en effet, en procédant à des lavages et des repiquages périodiques, prolonger la culture au-delà de 7 jours et voir ainsi les explants poursuivre leurs accroissements. Nous avons préféré, pour nos expériences, limiter à 7 jours la durée de la culture et ne faire pendant ce temps ni lavage ni repiquage. Cette manière de faire confère à la méthode une constance remarquable.

3. — Développement histologique.

Au moment de l'explantation, les trois zones de cellules cartilagineuses — rondes, aplaties et hypertrophiées — caractéristiques du développement normal, et décrites par FELL (1925), sont déjà indiquées. Après 7 jours de culture, la zone des chondroblastes hypertrophiés s'étend sur plus de la moitié de la longueur du tibia, tandis que les cellules devenues plus grandes présentent la vacuolisation caractéristique du cytoplasme cartilagineux. Un fourreau périostique jeune, garni d'ostéoblastes, plus ou moins épais et sinueux, recouvre la zone du cartilage hypertrophié. Les cellules de la région épiphysaire (fig. 4 a et b) ont également grandi, mais dans de plus faibles proportions. Au centre de l'épiphyse distale, on distingue très nettement une plage, dont les cellules s'ordonnent selon des lignes elliptiques. Ce sont des cellules d'aspect hypertrophié, et le maximum d'hypertrophie se rencontre au centre de l'ellipse. Ainsi la croissance du tibia cartilagineux, en culture *in vitro*, s'effectue confor-

mément à sa croissance dans l'embryon; elle est due à l'extension des cellules hypertrophiées, à une dilatation des cellules épiphysaires et au développement de la substance fondamentale accompagné par l'étirement du périoste. Toutefois le développement du périoste, *in vivo*, est plus rapide que le développement *in vitro*. Un tibia provenant d'un embryon de 8-8 1/2 jours présente un périoste analogue ou parfois mieux développé qu'un tibia prélevé à 7 jours et cultivé pendant 7 jours. Cette faible ossification périostique et l'absence totale d'ossification endochondrale ne sont pas étonnantes si l'on se souvient que le tibia, en explantation, est

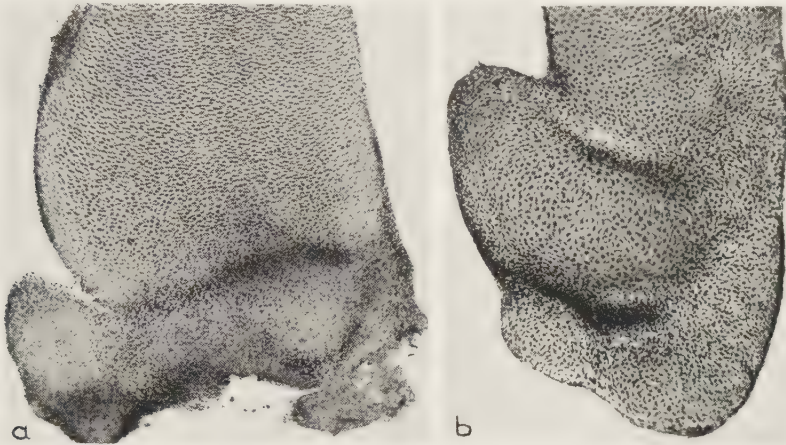


FIG. 4. — Section longitudinale de l'épiphyse distale d'un tibia de 7 jours (*a*), après 7 jours de culture sur milieu standard (*b*). Le centre l'épiphyse (*b*) montre une plage de cellules en voie d'hypertrophie. (Gr. : $\times 65$.)

privé de toutes voies de pénétration sanguine et d'une grande partie de son entourage conjonctif.

Ces observations anatomiques et histologiques des tibias cartilagineux cultivés selon la méthode mise au point par ET. WOLFF et K. HAFEN (1952) rejoignent les résultats obtenus par FELL et ROBISON (1929) sur un milieu constitué pour moitié de plasma de Poulet et pour moitié d'extrait embryonnaire. Nous avons explanté quelques tibias selon la méthode Fell et Robison, pendant 7 jours, avec repiquage les 3^e et 5^e jours de culture (fig. 5). Les tibias cultivés dans ces conditions (2 repiquages) donnent lieu à une croissance très importante et à une très belle morphogénèse des explants, supérieures à celles que nous observons habituellement sur le milieu standard. Cependant, cette croissance est toujours accompagnée d'essaimage cellulaire important, qui prive l'explant d'une partie de sa substance, et interdit ainsi les mesures d'augmentation pondérale et azotée. L'intérêt de la méthode d'ET. WOLFF et K. HAFEN réside

en ce qu'elle permet une vraie culture d'organe exempte de toute prolifération histiotypique. Les tibias sont cultivés sur le milieu standard, constitué d'extrait embryonnaire et d'un liquide physiologique glucosé et gélifié par de l'agar-agar (chapitre I), sans repiquage pendant 7 jours de culture. Ils accusent une croissance importante, bien qu'inférieure à celle observée sur le milieu beaucoup trop riche de Fell et Robison; mais cette croissance est constante et sûre (paragraphe suivant). Les explants n'essaient pas, maintiennent leur intégrité organique. Ainsi, ils peuvent donner lieu à des mesures quantitatives valables de l'augmentation pondérale et azotée.



FIG. 5. — Evolution d'un tibia d'embryon de Poulet de 7 jours, cultivé pendant 7 jours sur milieu Fell et Robison. L'explant a subi un lavage le 2^e jour de culture et a été repiqué les 3^e et 5^e jours de culture. Croissance linéaire de 4,1 à 6,7 mm. L'augmentation pondérale n'a pas pu être appréciée en raison de l'important essaimage cellulaire. Les silhouettes ont été dessinées au moment du prélèvement, les 2^e, 3^e, 4^e, 5^e, 6^e et 7^e jours de culture.

4. — *Relation entre la longueur du tibia au moment du prélèvement et le pourcentage de croissance linéaire.*

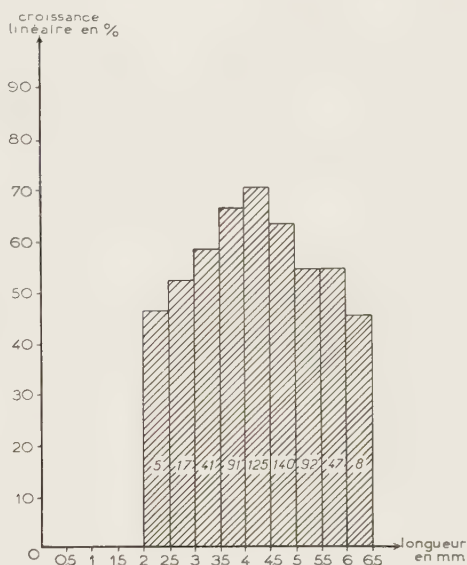
Nos premiers résultats de culture sur milieu standard ont été fournis par l'évolution de 26 tibias, qui se sont allongés en moyenne de 58 % pendant 7 jours de culture (ET. WOLFF, K. HOFFEN, M. KIENY et EM. WOLFF, 1953, et M. KIENY, 1953).

Ces premiers résultats ont été constamment confirmés au cours de 6 années de recherches. En tout, 566 tibias, pour la plupart témoins d'autres séries expérimentales, ont été explantés sur le milieu standard à base de jus d'embryons âgés de 9 à 12 jours d'incubation. Ces tibias s'allongent de 4,42 mm (moyenne pour les 566 tibias) à 7,05 mm, soit de 59 %. La constance de la croissance moyenne des tibias explantés,

selon la méthode ET. WOLFF et K. HAFEN, est remarquable. La figure 6, cependant, fait ressortir des variations de croissance selon la taille initiale de l'explant. Les longueurs initiales situées entre 3,5 mm et 5,0 mm correspondent à la meilleure croissance. Les tibias supérieurs à 5,0 mm s'allongent moins. Leur zone de cartilage hypertrophié est déjà fort étendue au moment de l'explantation. Il leur reste moins de cellules en voie d'hypertrophie et leur allongement s'en trouve ainsi restreint.

Les petits tibias, par contre, effectuent une moindre croissance pour des raisons toutes différentes. En effet, au moment de la mise en culture,

FIG. 6.
Variation du taux de croissance linéaire en fonction de la taille initiale de l'explant. Les chiffres dans les rectangles hachurés indiquent le nombre de tibias.



les cellules hypertrophiées sont encore rares ou inexistantes. On pourrait, dans ces conditions, s'attendre à un allongement considérable du tibia, mais la maturation de ses cellules, dans les cas les plus favorables, est à peine amorcée et il est probable que celles-ci réclament pour leur différenciation des substances nutritives ou organisatrices qu'elles ne trouvent pas dans le milieu standard uniquement à base d'extrait embryonnaire.

B. — INFLUENCE DES EXTRAITS D'EMBRYONS DE DIFFÉRENTS AGES SUR LA CROISSANCE DU TIBIA CARTILAGINEUX EN MILIEU STANDARD

MISZURSKI (1939) a montré que l'extrait embryonnaire de 7 jours provoque une croissance plus accentuée des tibias que celui de 13 ou de 19 jours. Au contraire, l'ossification n'apparaît pas dans les explants cultivés sur extrait de 7 jours, tandis qu'elle se présente lorsque l'on

emploie l'extrait d'embryons âgés de 13 ou de 19 jours. Néanmoins, cet auteur fait remarquer que les extraits âgés manifestent une certaine toxicité.

Nous nous sommes proposé de reprendre l'étude de l'influence de l'âge de l'extrait embryonnaire sur la croissance des tibias selon la méthode de culture en milieu standard. Toutes ces expériences sont faites avec un extrait embryonnaire dilué de moitié et centrifugé à 3 500 tours/minute pendant 45 minutes. L'âge du jus d'embryons varie de 5 à 18 jours.

Les résultats de la croissance linéaire sont consignés dans la figure 7 suivante :

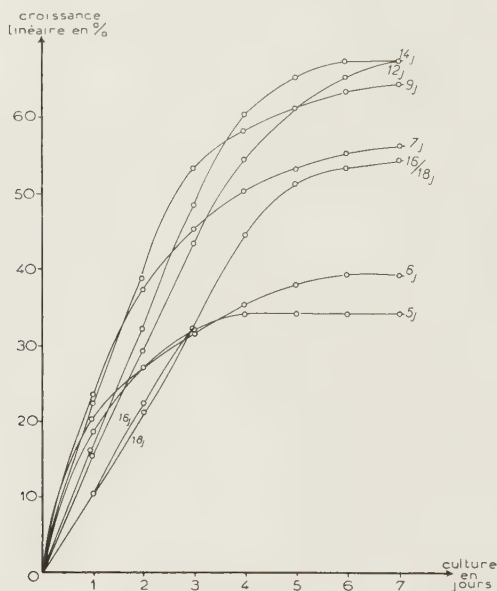


FIG. 7.

Influence des extraits d'embryons de différents âges sur la croissance du tibia cultivé en milieu standard.

On remarque que les jus d'embryons de 9 à 14 jours sont les plus favorables, ils assurent un allongement de 64 à 67 % (fig. 8). Les extraits d'embryons de 5 à 6 jours ne permettent pas une bonne survie des explants. En effet, dans 2 séries expérimentales sur 3, les tibias se sont nécrosés à partir du 3^e jour de culture.

Les tibias, qui ont servi aux mesures linéaires, ont été pesés au début et à la fin de la culture.

Le tableau II, où sont consignés ces résultats, permet de retrouver la supériorité des jus de 9 à 14 jours sur les autres.

Les résultats concernant les dosages de l'azote total des tibias, cultivés pendant 6-7 jours sur différents extraits embryonnaires, sont rapportés dans le tableau III. Les tibias de cette série ont donné lieu à des mesures

linéaires. Le chiffre de la dernière colonne représente la croissance linéaire moyenne d'un lot d'organes dosés. Ainsi, l'on est en mesure de comparer croissance linéaire et augmentation azotée.

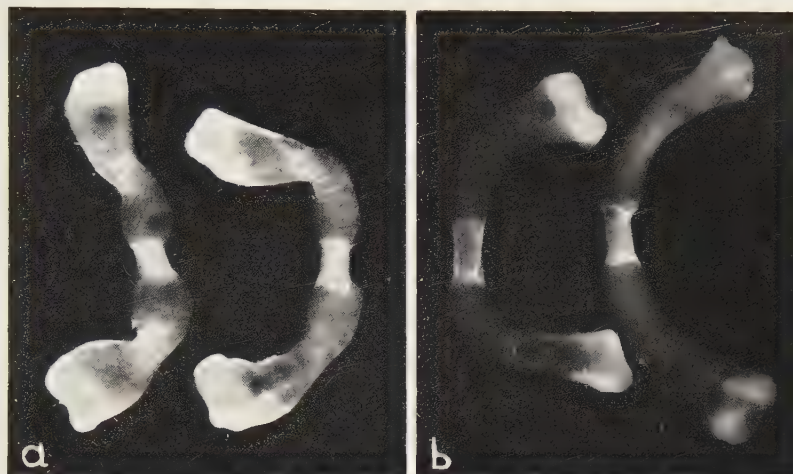


FIG. 8. — Tibias d'embryons de Poulet de 6 $\frac{3}{4}$ jours (a) et de 7 jours (b), cultivés pendant 7 jours sur milieu standard à base d'extrait d'embryons de 14 jours. Les tibias présentent une constriction qui les sangle dans leur partie médiane. L'ossification périostique est plus avancée chez les tibias de 7 jours (b). Croissance linéaire (de gauche à droite), figure a : 4,0 à 7,8 et 4,0 à 7,5 mm; figure b : 4,0 à 8,3 et 4,1 à 8,3 mm. Photographiés vivants. (Gr. : $\times 6,6$.)

Il faut remarquer qu'une croissance linéaire moyenne, inférieure ou égale à 50 %, n'est pas accompagnée d'un enrichissement en azote total.

De cet ensemble de mesures linéaires, pondérales et azotées il ressort

TABLEAU II
INFLUENCE DE L'ÂGE DE L'EXTRAIT D'EMBRYONS
SUR LA CROISSANCE LINÉAIRE ET SUR L'AUGMENTATION PONDÉRALE

Age de l'extrait d'embryons	Nombre de tibias	Croissance linéaire après 7 jours de culture	Augmentation pondérale après 7 jours de culture
5 jours	16	34 % $\pm$ 3 %	13 % $\pm$ 6 %
6 »	28	39 % $\pm$ 3 %	40 % $\pm$ 6 %
7 »	35	56 % $\pm$ 3 %	64 % $\pm$ 6 %
9 »	38	64 % $\pm$ 2,5 %	67 % $\pm$ 6 %
12 »	27	67 % $\pm$ 2,5 %	107 % $\pm$ 5 %
14 »	40	67 % $\pm$ 2,5 %	86 % $\pm$ 5 %
16 »	36	54 % $\pm$ 3 %	42 % $\pm$ 6 %
18 »	12	54 % $\pm$ 3 %	40 % $\pm$ 6 %

TABLEAU III

VARIATION DU TAUX D'N TOTAL DES TIBIAS EXPLANTÉS SUR MILIEU STANDARD
A BASE D'EXTRAITS D'EMBRYONS D'ÂGES DIFFÉRENTS

Age des embryons qui ont servi à la préparation de l'extrait	Stade des tibias explantés en jours	Nombre de tibias par lot	Teneur en N total en % par tibia		Variation du taux d'N total	Durée de la culture en jours	Croissance linéaire moyenne des explants (1)
			Au moment du prélè- vement	Après la culture			
5 jours.	7	3	8,0	8,4	+ 5	6	41 % ± 3 %
5 »	7	3	8,3	8,7	+ 5	6	52 % ± 3 %
7 »	7	3	8,4	11,6	+38	6	62 % ± 2,5 %
7 »	7	3	8,2	10,1	+23	6	60 % ± 2,5 %
7 »	7	3	7,0	9,2	+31	3	40 % ± 3 %
9 »	7	3	7,9	10,5	+33	6	70 % ± 2,5 %
9 »	7	3	8,2	10,5	+28	6	65 % ± 2,5 %
9 »	7	4	8,5	12,3	+45	3	54 % ± 3 %
12 »	7	4	7,4	14,2	+92	7	72 % ± 2 %
12 »	7	4	6,7	9,4	+40	7	62 % ± 2,5 %
12 »	7	4	5,8	9,6	+66	7	70 % ± 2 %
12 »	7	4	6,8	10,5	+54	7	73 % ± 2 %
12 »	7	4	6,1	9,7	+59	7	80 % ± 2 %
14 »	7	3	8,1	15,4	+90	6	61 % ± 2,5 %
14 »	7	3	8,0	14,3	+79	6	71 % ± 2,5 %
17 »	7	3	8,1	9,6	+19	6	38 % ± 3 %
17 »	7	3	6,6	6,4	- 3	6	28 % ± 3,5 %

(1) Le nombre derrière le signe ± représente les écarts dus aux erreurs de mesure des tibias.

que la valeur nutritive des extraits d'embryons âgés de moins de 7 jours et de plus de 16 jours est inférieure à celle des extraits d'embryons d'âge intermédiaire. Il est possible que les extraits d'embryons jeunes manquent de certaines substances nutritives. L'aspect des tibias cultivés sur milieux à base d'extraits d'embryons âgés fait plutôt penser à une certaine toxicité de ces derniers.

C. — REMPLACEMENT DE L'EXTRAIT EMBRYONNAIRE DU MILIEU STANDARD PAR DES LIQUIDES ORGANIQUES ADULTES

Le développement *in vitro* du tibia cartilagineux peut-il être favorisé par le remplacement total ou partiel de l'extrait embryonnaire par du sérum de Cheval (SS) ou du plasma de Poulet (PP) ? EM. WOLFF a montré que le remplacement total (1954) ou partiel (ET. WOLFF et EM. WOLFF, 1952) de l'extrait embryonnaire par du sérum de Cheval permet une meilleure différenciation des cartilages de la syrinx d'embryon d'Oiseau, que l'extrait embryonnaire seul.

1. — *Remplacement total de l'extrait embryonnaire
par un liquide organique adulte.*

L'extrait embryonnaire du milieu standard est remplacé par une quantité égale de sérum de Cheval (milieu SS) ou de plasma de Poulet (milieu PP). Les tibias, prélevés au 8^e jour d'incubation, sont cultivés, d'une part, sur milieu SS ou sur milieu PP, et, d'autre part, sur le milieu standard, à base d'extrait d'embryons de 12 jours, qui sert de témoin. Les explants ne sont ni repiqués ni lavés pendant les 7 jours que dure la culture.

Survie : les tibias survivent moins bien sur un milieu constitué de liquide organique adulte homologue ou hétérologue que sur le milieu à base d'extrait embryonnaire.

Morphogenèse : sur milieu PP, les explants s'enveloppent d'une culture de tissus, qui parfois peut être très importante, tandis que, sur milieu SS, la culture de tissus ne se produit pratiquement jamais. Toutefois, la morphogenèse débute dès la fin du premier jour de culture sur les

TABLEAU IV

CULTURE DE TIBIAS DE 7 JOURS
SUR MILIEUX A BASE DE LIQUIDES ORGANIQUES ADULTES :
PLASMA DE POULET (MILIEU PP), SÉRUM DE CHEVAL (MILIEU SS)

		Croissance linéaire après 7 jours de culture	Augmentation pondérale après 7 jours de culture
8 paires.	Milieu SS	42 % $\pm$ 2,5 %	52 % $\pm$ 6 %
	Milieu standard (témoins controlatéraux de SS)....	72 % $\pm$ 3 %	92 % $\pm$ 5 %
12 paires.	Milieu PP	38 % $\pm$ 2,5 %	56 % $\pm$ 6 %
	Milieu standard (témoins controlatéraux de PP)....	68 % $\pm$ 3 %	80 % $\pm$ 5,5 %

milieux SS et PP, elle ne commence qu'après 36 heures de culture sur milieu standard. Les épiphyses sont plus massives et d'un modelé plus précis.

Le développement périostique ne semble pas facilité par un liquide organique adulte.

Il ressort du tableau IV que les valeurs nutritives des deux liquides organiques sont très voisines, mais nettement inférieures à celle de l'extrait d'embryons de 12 jours. Ces résultats rejoignent ceux de CHEN (1954), qui montre que des ébauches de fémurs et de tibias de 6 1/2 jours, cultivées selon la méthode Fell et Robison, sur un milieu constitué de plasma coagulé par de la thrombine, se comportent comme sur le

milieu complet (plasma + extrait embryonnaire). Toutefois la croissance n'atteint que 75 % environ de la croissance observée sur le milieu complet.

Les dosages de l'azote total confirment la supériorité de l'extrait embryonnaire (tableau V). Contrairement au jus d'embryons, le sérum de Cheval et le plasma de Poulet ne favorisent pas l'augmentation de la teneur en azote. Malgré une croissance linéaire appréciable et une augmentation pondérale importante, le taux d'azote total, après 7 jours de culture, reste stationnaire.

TABLEAU V
VARIATION DU TAUX D'N TOTAL
DES TIBIAS EXPLANTÉS SUR MILIEUX A BASE DE SÉRUM DE CHEVAL
OU DE PLASMA DE POULET

Liquide nutritif	Nombre d'organes par lot	Teneur en N total en % par tibia		Variation du taux d'azote total	Croissance linéaire moyenne
		Au moment du prélèvement	Après 7 jours de culture		
Sérum de Cheval.	4	10,2	10,2	0	41 % $\pm$ 2,5 %
	3	9,8	10,3	+ 5	30 % $\pm$ 3 %
	3	7,8	7,5	- 4	38 % $\pm$ 3 %
Plasma de Poulet.	4	9,7	9	- 7	39 % $\pm$ 3 %
	3	9,7	11,5	+18	31 % $\pm$ 3 %
	3	7,3	7,1	- 3	38 % $\pm$ 3 %

Erreur maximum : 5 %

2. — Remplacement partiel de l'extrait embryonnaire par l'un des liquides organiques adultes.

a) *Tibias prélevés sur des embryons de 5 à 6 jours d'incubation.* — Explantés sur milieu à base d'extrait embryonnaire et de plasma de Poulet, milieu EE + PP, 30 tibias, dont la longueur initiale se situe entre 1,6 mm et 3,0 mm, doublent de taille après 7 jours de culture (moyenne : 2,4 mm à 4,8 mm) et amorcent leur morphogenèse dès le 2^e jour de culture. Contrairement au milieu PP, le milieu EE + PP ne provoque que très rarement l'essaimage des cellules des tibias.

28 tibias témoins, cultivés sur milieu standard, n'effectuent qu'une croissance linéaire de 48 % (moyenne : 2,5 mm à 3,7 mm) après 7 jours de culture. La morphogenèse met 2-3 jours à s'installer et le modelé des facettes articulaires reste plus discret que sur le milieu EE + PP.

Le milieu à base d'extrait embryonnaire seul est nettement moins favorable à la morphogenèse et à la croissance des tibias de 5-6 jours que

le milieu contenant à la fois de l'extrait embryonnaire et du plasma de Poulet, mais la survie est équivalente sur les deux milieux.

Quelques croissances maximums après 7 jours de culture :

Milieu EE + PP	Milieu EE (standard)
1,8 à 4,8 mm = 166 % $\pm$ 10 %	1,8 à 2,7 mm = 50 % $\pm$ 7 %
1,7 à 3,8 mm = 124 % $\pm$ 10 %	1,6 à 2,5 mm = 56 % $\pm$ 8 %
1,9 à 4,6 mm = 144 % $\pm$ 9 %	3,0 à 4,8 mm = 60 % $\pm$ 5 %

Ces expériences montrent que les tibias, dont les tailles initiales s'échelonnent de 1,6 mm à 3,0 mm, requièrent le plasma de Poulet pour amorcer leur maturation cartilagineuse. Ces résultats rejoignent ceux de ET. WOLFF et de EM. WOLFF (1952), qui montrent que les syrinx embryonnaires ne « réalisent pas toutes leurs possibilités de différenciation en présence d'extrait embryonnaire seul ». CARPENTER (1950) signale une moindre excroissance fibroblastique des fémurs cultivés, selon la méthode Fell et Robison, sur un milieu constitué d'extrait embryonnaire de 11 jours et de fibrinogène ou de plasma sec de Bovidé, que des fémurs explantés sur milieu à base d'extrait embryonnaire et de plasma sec ou frais de Poulet. Ce résultat montre l'importance nutritive du plasma dans un milieu.

b) *Tibias de 7 jours d'incubation.* — Dans cette série expérimentale, nous explantons des tibias sur milieu EE + PP ou EE + SS, tandis que les témoins controlatéraux sont cultivés sur milieu standard, à base d'extrait d'embryons de 12 jours.

L'action très favorable du plasma de Poulet sur la croissance des tibias de 5 à 6 jours ne se retrouve pas dans le cas des tibias de 7 jours; mais l'action sur la morphogenèse est maintenue. En effet, sur milieu EE + PP, les tibias se façonnent plus rapidement que sur milieu standard (fig. 9 a et b).

Le tableau ci-dessous montre que le plasma de Poulet et le sérum de

TABLEAU VI

REMPLACEMENT PARTIEL DE L'EXTRAIT EMBRYONNAIRE DU MILIEU STANDARD (MILIEU St)
PAR DU PLASMA DE POULET (MILIEU EE + PP)
OU DU SÉRUM DE CHEVAL (MILIEU EE + SS)

		Croissance linéaire après 7 jours de culture	Augmentation pondérale après 7 jours de culture
12 paires.	Milieu EE + PP	55 % $\pm$ 3 %	94 % $\pm$ 6 %
	Milieu St (témoins controlatéraux de EE + PP).....	63 % $\pm$ 2,5 %	72 % $\pm$ 6 %
8 paires.	Milieu EE + SS	48 % $\pm$ 2,5 %	86 % $\pm$ 6 %
	Milieu St (témoins controlatéraux de EE + SS).....	61 % $\pm$ 2,5 %	106 % $\pm$ 5 %

Cheval n'apportent rien au tibia de 7 jours dont il puisse tirer parti pour sa croissance. Il trouve dans l'extrait embryonnaire toutes les substances nécessaires à son accroissement.

D'autre part, le tableau VI montre que le plasma de Poulet, liquide orga-

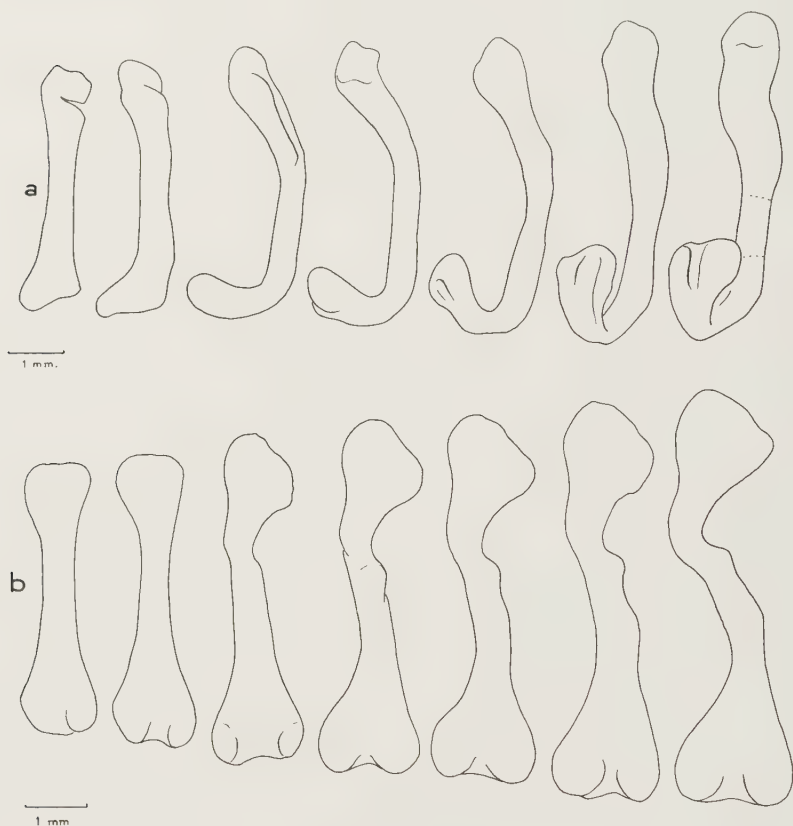


FIG. 9. — Evolution des tibias d'un embryon de Poulet de 7 jours, cultivés pendant 7 jours sur milieu standard, d'une part (a), sur milieu à base d'extrait embryonnaire et de plasma de Poulet, milieu EE + PP, d'autre part (b). Sur milieu EE + PP, les épiphyses deviennent plus massives que sur milieu standard. Croissance linéaire : a : 4,0 à 6,3 mm; b : 4,2 à 6,7 mm. Augmentation pondérale : a : 1,0 à 2,0 mg; b : 1,3 à 2,9 mg. Les silhouettes ont été dessinées au moment du prélèvement, les 2^e, 3^e, 4^e, 5^e, 6^e et 7^e jours de culture.

nique adulte, homologue, favorise l'augmentation pondérale ($P = 0,05$). Ceci s'explique en partie par la morphogenèse plus accentuée que l'on observe sur le milieu EE + PP.

Enfin, le sérum de Cheval, liquide organique hétérologue, est moins bien toléré que le plasma de Poulet.

En conclusion, le sérum de Cheval ou le plasma de Poulet ne peuvent se substituer à l'extrait embryonnaire.

En présence d'extrait embryonnaire, ces liquides organiques adultes améliorent la morphogenèse des tibias de 5 à 6 jours ou de 7 jours d'incubation, et la croissance des tibias de 5 à 6 jours.

Il ressort de ces expériences que la culture *in vitro* du tibia cartilagineux se dissocie en deux phases :

1° la maturation cartilagineuse (tibias de 5-6 jours) qui nécessite la présence simultanée d'extrait embryonnaire et de plasma de Poulet;

2° la croissance proprement dite, pour laquelle l'extrait embryonnaire seul apporte les substances nutritives appropriées.

D. — CONCLUSIONS

La méthode de culture d'organes, mise au point par Et. WOLFF et K. HAFEN, permet de suivre le développement d'un os cartilagineux soustrait à l'ensemble de l'organisme. Les tibias d'embryons de Poulet, prélevés au 8^e jour d'incubation et explantés, *in vitro*, dans le milieu de culture standard, s'autodifférencient et se développent comme dans un embryon normal, mais plus lentement. Ils s'allongent de 58 %, augmentent leur poids de 80 % et s'enrichissent en azote de 55 à 91 %, après 7 jours de culture.

On peut constater que le milieu standard à base d'extrait embryonnaire de 9-14 jours est un milieu très constant par ses résultats. Il n'est cependant pas le milieu requis pour obtenir une croissance et une morphogenèse optimums. Nous avons vu que, dans certaines conditions, un apport nutritif supplémentaire renforce son action. Néanmoins, ce milieu standard, uniquement à base d'extrait embryonnaire, va nous servir de témoin principal pour l'étude des besoins nutritifs des os cartilagineux en culture *in vitro* sur milieu synthétique.

III. — ESSAIS DE REMPLACEMENT DE L'EXTRAIT D'EMBRYON PAR DES SOLUTIONS CHIMIQUEMENT DÉFINIES

Nous venons de voir que le milieu naturel standard, utilisé dans nos recherches, est beaucoup moins nutritif que celui qu'ont employé avec succès FELL (1928) et tous les auteurs qui se sont servis de sa méthode. Mais le milieu standard donne lieu à une croissance constante et sûre.

Le milieu standard, mis au point par Et. WOLFF et K. HAFEN, contient, comme unique constituant complexe, l'extrait d'embryon. Ce milieu simple peut-il encore être simplifié ? Peut-on substituer à cet extrait

embryonnaire un mélange de substances chimiquement définies, telles que sucres, peptides simples, vitamines ? Ainsi l'on remplacerait un milieu naturel par un milieu synthétique.

De nombreux auteurs (FISCHER; MORGAN, MORTON et PARKER; WHITE; WAYMOUTH) ont essayé de cultiver des tissus en milieux semi-synthétiques ou synthétiques. Il semble qu'en général ces auteurs n'aient obtenu que de la survie et de la migration des cellules explantées, du moins sur les milieux de composition chimiquement définie. Depuis 1954, PARKER et ses collaborateurs ont réussi, en modifiant, et la composition du milieu synthétique initial, et la méthode d'explantation, à obtenir de la prolifération cellulaire sur un milieu entièrement synthétique. De même, EARLE et ses collaborateurs (1956) ont réussi à cultiver des cellules de souche L pendant une période très appréciable sur un milieu chimiquement défini.

Tous ces milieux contiennent de nombreux ingrédients (91 ingrédients pour le milieu 199 de PARKER), et seul le milieu préconisé par FISCHER (1941) est un mélange de 9 acides aminés ajouté à du plasma dialysé.

L'un des premiers mélanges synthétiques que nous ayons employé, en collaboration avec ET. WOLFF, EM. WOLFF et K. HOFFEN, était inspiré de celui de BERGMANN et NIEMANN et utilisé par FISCHER (1941), et par JENSEN (1948), à d'autres fins. Notre mélange diffère de celui qu'avaient employé ces deux auteurs par le remplacement de la cystine par une quantité équivalente de cystéine. Nous nous sommes proposé d'étudier le comportement du tibia cartilagineux sur un milieu à base de sels minéraux, de glucose et d'acides aminés et de le comparer à son comportement sur milieu standard, d'une part, sur un milieu réduit aux sels minéraux et au glucose, d'autre part.

Voyons tout d'abord comment évolue un tibia explanté sur un milieu dépourvu de substances azotées.

A. — MILIEU T + P DÉPOURVU D'EXTRAIT EMBRYONNAIRE

Explantés sur un milieu composé uniquement de gélose et de liquide de Tyrode glucosé, additionné d'une petite goutte de pénicilline, milieu T + P, les tibias prélevés au 8^e jour d'incubation n'effectuent aucune morphogenèse. Cependant, la survie partielle peut durer jusqu'au 8^e jour de culture.

Les mesures quotidiennes des explants ont permis de mettre en évidence une faible croissance linéaire, qui est de 13 %. La longueur moyenne au moment du prélèvement est de 4,0 mm; après 7 jours de culture elle est de 4,5 mm. Il faut noter que cette taille est atteinte dès la fin du 2^e jour. L'augmentation pondérale est de 4 %. La marge d'erreur étant de ± 5 % (tableau VII), l'augmentation n'est pas significative. Après

TABLEAU VII

ACCROISSEMENT DE LA LONGUEUR
ET DU POIDS DES TIBIAS CULTIVÉS EN MILIEUX SYNTHÉTIQUES

Milieu éprouvé	Nombre de tibias par expérience	Croissance linéaire			Augmentation pondérale		
		Longueur moyenne d'un tibia en mm		Accroissement	Poids moyen d'un tibia en mg		Accroissement
		Au moment du prélèvement	Après 7 jours de culture		Au moment du prélèvement	Après 7 jours de culture	
B/10 + P	24	4,2	5,5	31 % $\pm$ 2,5 %	1,3	1,7	34 % $\pm$ 5,5 %
B/10	20	4,4	4,9	11 % $\pm$ 3 %	1,3	1,3	0 %
C/10 + P	12	4,3	5,5	28 % $\pm$ 3 %	1,2	1,6	30 % $\pm$ 5 %
C/10	12	4,4	5,0	13 % $\pm$ 2,5 %	1,4	1,5	8 % $\pm$ 4,5 %
T + P	9	4,0	4,5	13 % $\pm$ 3 %	1,1	1,2	4 % $\pm$ 5 %
T	9	3,8	3,9	3 % $\pm$ 3 %	1,0	0,9	-10 % $\pm$ 7 %

TABLEAU VIII

RÉSULTATS DES DOSAGES D'AZOTE TOTAL DES TIBIAS
AVANT ET APRÈS L'EXPLANTATION

Milieu étudié	Stade en jours	Nombre d'organes par essai	Durée de la culture	Teneur en N total en % par tibia		Variation en %
				Avant l'explantation	Après l'explantation	
B/10 + P	7	4	7 jours.	9,7	8,8	— 9
B/10 + P	7	4	7 »	7,9	7,4	— 6
B/10 + P	7	4	5 »	7,8	7	—10
B/10 + P	7	4	3 »	6,9	6,3	— 9
B/10 + P	7	4	3 »	8,3	7,2	—13
B/10 + P	7	4	3 »	7,3	6,9	— 5
B/10 + P	7	4	3 »	7,7	8,2	+ 6
B/10	7	4	7 »	9,3	6,5	—30
B/10	7	4	7 »	8,4	6,9	—18
B/10	7	4	5 »	9,6	6,6	—32
B/10	7	4	3 »	9,8	7,1	—29
C/10 + P	7	4	7 »	7,7	6,8	—12
C/10	7	4	7 »	12,5	7,8	—37
C/10	7	4	7 »	11,8	8,9	—25
T + P	7	4	7 »	8,5	6,9	—19
T + P	7	4	7 »	10	7,7	—23
T + P	7	4	3 »	7,5	6,5	—13
T	7	4	3 »	7,7	5,4	—30
T	7	4	2 »	9,7	7,3	—25

Erreur maximum : 5 %.

7 jours de culture, les dosages d'azote, effectués à l'aide de l'ultra-micro-méthode de Kjeldahl, nous ont donné une perte qui est de l'ordre de 13 à 23 % (tableau VIII).

Les investigations histologiques ont montré que la diaphyse est toujours en bon état, mais que la région épiphysaire tend à se nécroser avant la fin de la culture. En comparant un tibia explanté sur milieu T + P avec son témoin controlatéral, non cultivé, on ne voit pratiquement aucune différence, si ce n'est une zone diaphysaire à peine plus étendue et des épiphyses dans lesquelles la nécrose a pu s'installer.

B. — MILIEU CONTENANT 9 ACIDES AMINÉS, MILIEU B + P

Le mélange d'acides aminés « B » (d'après BERGMANN et NIEMANN) a la composition suivante :

L (+) arginine base	30,8 mg
L (—) cystéine HCl	6,0 »
DL-méthionine	10,4 »
L (+) lysine 2 HCl	60,4 »
ac. L (+) glutamique	56,4 »
DL-histidine HCl	12,4 »
proline	20,4 »
ac. DL-aspartique	23,6 »
tryptophane	20,0 »
pour 100 cm ³ de liquide de Tyrode.	

Ce mélange, soit tel quel (B 1/1), soit dilué de moitié (B/2), soit dilué 10 fois (B/10), dans du liquide de Tyrode, a été incorporé au milieu suivant :

Gélose à 1 % préparée dans du liquide de Gey.

Solution B1/n.

Pénicilline encore dénommée « solution P ».

L'incorporation de la solution B/10 a donné les meilleurs résultats. En effet, les milieux B/2 + P, et tout particulièrement les milieux B + P, se sont révélés plus ou moins inhibiteurs, voire toxiques.

24 tibias, prélevés sur des embryons de 7 à 7 1/2 jours d'incubation et explantés sur le milieu B/10 + P, évoluent comme ceux qui sont explantés sur le milieu standard (fig. 10 et 11). Tous les tibias survivent jusqu'à la fin de la culture (7 jours). Ils continuent leur morphogenèse : les épiphyses se façonnent; on voit apparaître les condyles à l'extrémité distale et l'apophyse cnémiale à l'extrémité proximale (fig. 14, 15). La diaphyse s'allonge, ce qui se manifeste par une coudure notable de l'explant. Cette coudure demeure toutefois de moindre envergure que celle observée sur

le milieu à base d'extrait embryonnaire. L'allongement moyen est de 31 % et l'augmentation pondérale moyenne de 34 %. Malgré une bonne différenciation morphologique, un allongement et une augmentation pondérale appréciables, le taux d'azote total des explants subit un abaissement voisin de 10 % (tableau VIII).

Les tibias explantés sur milieu B/10 + P ne se distinguent guère, histologiquement, de ceux explantés sur milieu naturel standard. La seule



FIG. 10. — Tibias d'un embryon de Poulet de 7 jours, cultivés pendant 7 jours, d'une part (a) sur milieu T + P, d'autre part sur milieu synthétique B/10 + P (b). Croissance linéaire sur T + P : 3,6 à 3,9 mm; sur B/10 + P : 3,9 à 5,4 mm. Augmentation pondérale sur B/10 + P : 1,0 à 1,6 mg.

différence réside dans une zone hypertrophiée moins étendue, ce qui correspond à une moindre croissance linéaire. Au centre de la région épiphysaire, nous retrouvons une plage de cellules en voie d'hypertrophie, tout comme sur milieu naturel, mais avec cette différence que très souvent les cellules du centre de l'épiphyse sont en moins bon état (fig. 12). Le milieu B/10 + P, contenant 9 acides aminés et de la solution P, s'il permet un accroissement important et une bonne différenciation du tibia,



FIG. 11.

Comparaison entre le développement de tibias de 7 jours, cultivés sur milieux standard (a), T + P (b) glucosé sans substances azotées, sur milieu B/10 + P (c) contenant des acides aminés. On remarque que la croissance en milieu synthétique B/10 + P est importante, mais n'atteint pas la valeur qu'elle prend sur milieu naturel standard. Photographie prise après fixation. (Gr. : $\times 10$.)

FIG. 12.

Section longitudinale dans la région de l'épiphyse distale d'un tibia d'embryon de Poulet de 7 jours, cultivé pendant 7 jours sur milieu synthétique B/10 + P. (Gr. : $\times 100$.)



est donc encore d'une qualité inférieure à celle du milieu standard. L'écart entre ces deux milieux peut-il être comblé par l'addition d'autres acides aminés ?

C. — MILIEU SYNTHÉTIQUE CONTENANT 21 ACIDES AMINÉS,
MILIEU C + P.

En utilisant les résultats obtenus par MORGAN, MORTON et PARKER (1950), par WHITE (1946) et par WAYMOUTH (1951), en consultant la liste, donnée par EARLE (1952), des acides aminés présents dans l'ultrafiltrat de sérum et dans l'extrait embryonnaire et celle, donnée par ROSE (1938), des acides aminés essentiels pour la croissance des organismes, nous avons été

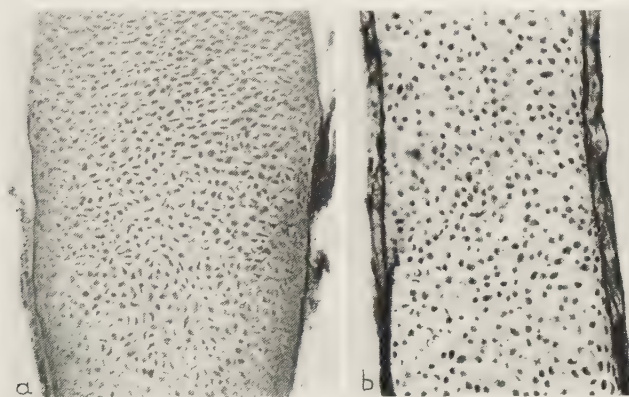


FIG. 13. — Section longitudinale à travers la diaphyse d'un tibia de 7 jours (a) explanté sur milieu synthétique C/10 + P pendant 7 jours (b).
(Gr. : $\times 100$.)

amenés à sélectionner 12 acides aminés, que nous avons ajoutés à la solution B.

La solution ainsi constituée, que nous dénommons C, contient, outre les acides aminés du mélange B, les acides aminés suivants : phénylalanine, leucine, isoleucine, thréonine, valine, glycine, tyrosine, hydroxproline, sérine, taurine, ornithine, asparagine.

Comme pour la solution B, la concentration 1/10 s'est révélée la plus favorable. Nous appelons ce milieu, milieu C/10 + P.

Contrairement à notre attente, le milieu C/10 + P ne s'est pas révélé meilleur que le milieu B/10 + P, malgré la présence de nombreux acides aminés pourtant réputés importants. En effet, les 12 tibias explantés sur ce milieu se sont allongés de 28 % et ont augmenté leur poids de 30 % (fig. 13). Comme sur le milieu B/10 + P, les tibias n'augmentent pas leur teneur en azote total (tableau VIII).

D. — MISE EN ÉVIDENCE D'UN FACTEUR DE CROISSANCE:
L'ACIDE PARA-AMINO BENZOÏQUE (P-AB)

Dans nos expériences sur l'étude des milieux naturels, d'une part, et des milieux synthétiques, d'autre part, nous avons employé la spécilline-subtosan, à raison d'une goutte par milieu (100 à 200 Unités Oxford), pour augmenter les garanties d'asepsie. Cette spécilline-subtosan, que nous dénommons solution P, contient un mélange de 200 000 Unités Oxford de pénicilline G (sel de Na) et de 0,05 g de novocaïne dans 10 cm³ de polyvinylpyrrolidone.

Etant donné que nous nous proposons d'étudier un milieu synthétique ne contenant que des sels minéraux, du glucose et des acides aminés, il est normal d'envisager la suppression du complexe spécilline-subtosan, en augmentant toutes les précautions d'asepsie. Nous avons été étonnés de constater qu'un tel milieu, milieu B/10 ou C/10, dépourvu de la solution P, ne permet qu'une très faible croissance linéaire et croissance pondérale (fig. 14). Même le milieu T est inférieur au milieu T + P (tableau VII). L'abaissement de la teneur en azote total est encore plus accentué (tableau VIII).

La solution P, par l'un de ses constituants, non seulement favorise les croissances linéaire et pondérale, mais encore elle diminue la perte azotée des tibias cultivés en milieux synthétiques. Il ne semble pas que la solution P favorise uniquement l'absorption de l'eau et des sels minéraux, car le milieu T + P dépourvu de substances azotées ne permet qu'une faible augmentation pondérale. On peut penser qu'elle favorise l'utilisation des acides aminés du milieu dans les synthèses protéiques.

Quel est le facteur contenu dans la solution P, responsable de cet effet ?

Des essais préliminaires montrèrent que le sel de Na de pénicilline G (100-200 Unités Oxford par milieu) est nocif et amène une nécrose rapide des explants et que le polyvinylpyrrolidone est inactif (fig. 15). La novocaïne se révéla être l'élément favorable contenu dans la solution P (1953). La novocaïne étant elle-même la combinaison de diéthylamino-éthanol et d'acide para-aminobenzoïque (vitamine H'), nous avons étudié le rôle de ce dernier dans la culture des tibias sur le milieu B/10.

L'acide para-aminobenzoïque (p-ab) a été employé tel quel ou sous forme de son sel de Na. Les deux substances se comportent de la même manière. Le p-ab a été ajouté à la concentration 1/10³, qui est la concentration la plus favorable, au milieu synthétique qui se prépare ainsi :

Gélose dans du liquide de Gey	9 parties
Solution B/10	6 »
Solution de p-ab (ou de son sel) dans l'eau bidistillée..	1 »

Deux séries d'explantations sont menées parallèlement. Dans la première, 45 tibias sont cultivés sur milieu B/10 additionné d'une goutte

FIG. 14.

FIG. 16.



FIG. 15.

FIG. 14. — Comparaison entre le développement de tibias de 7 jours sur milieu synthétique B/10 + P (b), sur milieu B/10 (c) et sur milieu standard naturel (a). *Milieu standard* : crois. lin. : 4,7 à 7,7 mm; aug. pond. : 1,7 à 2,8 mg. *Milieu B/10 + P* : crois. lin. : 4,7 à 6,8 mm; aug. pond. : 1,4 à 2,3 mg. *Milieu B/10* : crois. lin. : 4,7 à 5,4 mm; aug. pond. : 1,4 à 1,5 mg. Photographiés vivants. (Gr. : $\times 6,6$.)

FIG. 15. — Comparaison du développement de tibias d'embryons de Poulet de 7 jours, cultivés sur milieu synthétique B/10 (d), additionné de la solution P (a), de novocaïne (b), du sel de Na de pénicilline G (c). Les tibias b et c sont des ébauches controlatérales. On remarque que la novocaïne est l'élément favorable contenu dans la solution P. Photographies prises après fixation au liquide de Bouin. (Gr. : $\times 6$.)

FIG. 16. — Tibias d'un embryon de poulet de 7 jours, cultivés pendant 7 jours, d'une part (à gauche) sur milieu B/10 + p-ab, d'autre part, sur milieu B/10. L'action favorable, même indispensable de l'acide para-aminobenzoïque est très nette. Photographiés vivants. (Gr. : $\times 6,6$.)

de p-ab, milieu B/10 + p-ab; dans la deuxième, qui sert de témoin, 30 tibias sont cultivés sur milieu B/10.

Sur le milieu B/10 + p-ab, les tibias poursuivent leur morphogénèse; les épiphyses, d'abord peu renflées, s'épaississent et se façonnent comme sur le milieu B/10 + P. Par contre, les tibias cultivés sur milieu B/10 ne montrent qu'une faible croissance et la nécrose s'installe souvent avant la fin de la culture (fig 16). Après 7 jours de culture, les tibias accusent une croissance linéaire de 25 % (1) sur milieu B/10 + p-ab et seulement de 14 % sur milieu B/10 ($P < 0,01$). La différence entre les augmentations pondérales est encore plus marquée; elle est nulle (— 4 %) sur milieu B/10, de 20 % sur milieu B/10 + p-ab ($P < 0,01$) (tableau IX).

TABLEAU IX
ACTION DE L'ACIDE PARA-AMINOBENZOÏQUE
SUR LA CROISSANCE DES TIBIAS

Milieu éprouvé	Nombre de tibias par expérience	Allongement	Variation pondérale
B/10 + p-ab	20	25 %	+ 17 %
	19	25 %	+ 21 %
	6	26 %	+ 28 %
Moyenne.....		25 % $\pm$ 3 %	+ 20 % $\pm$ 6 %
B/10	6	12 %	— 8 %
	10	15 %	— 5 %
	14	13 %	— 2 %
Moyenne.....		14 % $\pm$ 2,5 %	— 4 % $\pm$ 4 %

La différence de croissance entre les tibias explantés sur milieu B/10 + p-ab (croissance linéaire : 25 %; croissance pondérale : 20 %) et milieu B/10 + P (croissance linéaire : 31 %; augmentation pondérale : 34 %) ne signifie pas que la solution P exerce une action adjuvante meilleure que le p-ab. En effet, comme nous le verrons dans le chapitre VII, on peut expliquer cette différence par le fait que ces deux séries expérimentales n'ont pas été réalisées à la même époque de l'année. L'acide para-aminobenzoïque est le seul constituant de la solution P responsable des pourcentages de croissance obtenus avec

(1) Une erreur matérielle nous a conduit à publier dans une note préliminaire (1953) une croissance linéaire de 20 % pour les 45 tibias cultivés sur milieu B/10 + p-ab, au lieu de 25 %.

les milieux qui la contiennent. Faites à une même époque, les expériences fournissent les mêmes résultats, que les milieux contiennent le p-ab ou la solution P :

	Nombre de tibias	Croissance linéaire après 7 jours de culture	Augmentation pondérale après 7 jours de culture
B/10 + P	12	26 % $\pm$ 3 %	21 % $\pm$ 5 %
B/10 + p-ab	30	28 % $\pm$ 3 %	24 % $\pm$ 6 %

L'acide para-aminobenzoïque nous apparaît comme une substance très favorable au développement, *in vitro*, des tibias embryonnaires. Il semble jouer le rôle d'un catalyseur, qui rendrait l'explant capable d'utiliser les acides aminés du milieu.

E. — CONCLUSIONS

Les tibias ont été prélevés et isolés à un stade où ils se présentent sous forme de baguette cartilagineuse. Leur différenciation morphologique se poursuit, *in vitro*, en milieux synthétiques, comme en milieux naturels. L'explant s'allonge, les épiphyses se façonnent. Mais la croissance et le développement morphologique ne correspondent pas à un enrichissement en azote total du tibia. Dans les cultures en milieu naturel, à base d'extrait embryonnaire, l'accroissement est accompagné d'une augmentation notable de la teneur en azote total de l'explant.

Cependant, en comparant les résultats obtenus avec les différents milieux, on remarque que l'acide para-aminobenzoïque, ajouté au milieu B/10 ou C/10, non seulement favorise la croissance pondérale, mais encore diminue la perte azotée des explants. Il apparaît donc que l'augmentation pondérale des tibias n'est pas uniquement due à une absorption d'eau et de sels minéraux, mais est le résultat d'une assimilation des acides aminés facilitée par l'acide para-aminobenzoïque. Cette assimilation n'étant pourtant pas suffisante pour compenser les processus de désassimilation du tibia cultivé en milieu synthétique, le bilan azoté reste négatif.

En définitive, nous pouvons dire que les milieux synthétiques, uniquement à base de 9 ou 21 acides aminés et d'un facteur de croissance, l'acide para-aminozenboïque, permettent la survie, la différenciation morphologique et la croissance des tibias sans atteindre les résultats obtenus à l'aide de l'extrait embryonnaire. D'autre part, la valeur nutritive de ces milieux est voisine de celle des milieux à base de liquides organiques adultes, tels que sérum de Cheval et plasma de Poulet, en ce qui concerne la croissance linéaire et la variation du taux d'azote.

IV. — BESOINS NUTRITIFS MINIMUMS
DE LA CROISSANCE
DU TIBIA CARTILAGINEUX

Nous avons montré dans le chapitre précédent que les milieux complexes B et C entretiennent la vie et la croissance des tibias cartilagineux. Nous nous proposons de préciser quels sont, parmi les 21 acides aminés du milieu C, ceux qui sont essentiels, favorables ou inhibiteurs.

Ce programme de travail a été entrepris en deux étapes :

1° Elaboration d'un milieu qui contient un plus petit nombre d'acides aminés que le milieu B/10; on aboutit à un milieu réduit ne contenant que 6 acides aminés.

2° Amélioration de ce milieu réduit par élimination ou adjonction de certains acides aminés.

A. — ELABORATION DU MILIEU RÉDUIT 60 + P-AB.

Les expériences consistent à déterminer les acides aminés, dont l'absence du milieu B/10 + p-ab ne diminue pas le taux de croissance des tibias. Ainsi le tryptophane, l'acide aspartique et la proline ont été retirés d'abord séparément, puis simultanément, sans que la valeur du milieu B/10 + p-ab s'en soit trouvée amoindrie.

En effet, le milieu ainsi obtenu, appelé milieu 60 + p-ab, contient l'arginine, la cystéine, la méthionine, la lysine, l'acide glutamique, l'histidine et l'acide para-aminobenzoïque aux mêmes concentrations que dans le milieu B/10 + p-ab et donne les mêmes résultats que le milieu B/10 + p-ab (tableau X).

TABLEAU X

COMPARAISON DES MILIEUX B/10 + P-AB ET 60 + P-AB

Milieux	Nombre de tibias	Croissances	
		linéaire après 5 jours de culture	pondérale après 5 jours de culture
B/10 + p-ab	25	20 % $\pm$ 3 %	15 % $\pm$ 5 %
60 + p-ab	28	20 % $\pm$ 3 %	13 % $\pm$ 5 %

Ce milieu 60 + p-ab assure la même survie et la même croissance que les milieux complexes.

La composition de ce milieu est voisine de celle d'un milieu réduit déjà élaboré par EM. WOLFF et K. STENGER-HAFFEN, en 1954, pour la survie et la différenciation de la syrinx et des gonades. Il n'en diffère que par la présence d'acide glutamique, d'acide para-aminobenzoïque et par les concentrations 5 fois moindres des acides aminés. Désormais, nous adoptons ce milieu 60 + p-ab comme milieu de référence et étudions les variations de ses propriétés par la suppression ou l'adjonction de certains acides aminés.



FIG. 17.



FIG. 18.

FIG. 17. — Tibias d'un embryon de Poulet de 7 jours, cultivés pendant 7 jours, d'une part (à gauche) sur milieu 60 + p-ab, d'autre part (à droite) sur milieu 60. Milieu 60 + p-ab : cr. lin. : 4,7 à 6,8 mm; aug. pond. : 1,4 à 2,3 mg. Milieu 60 : cr. lin. : 4,7 à 5,4 mm; aug. pond. : 1,4 à 1,5 mg. Photographiés vivants. (Gr. : $\times 8$.)

FIG. 18. — Action combinée de l'acide glutamique et de l'histidine. Tibias d'un embryon de Poulet de 7 jours, cultivés pendant 5 jours, d'une part sur milieu contenant de l'arginine, de la cystéine, de la méthionine, de la lysine et de l'acide para-aminobenzoïque (à gauche), d'autre part sur ce même milieu additionné d'acide glutamique et d'histidine, milieu 60 + p-ab (à droite) (tableau VI, 4^e ligne). L'histidine ajoutée au milieu AMCL + p-ab n'agit qu'en présence d'acide glutamique, ajoutée isolément elle diminue encore la valeur de ce milieu. Photographie prise après fixation au liquide de Bouin (Gr. : $\times 7,5$.)

La croissance linéaire et pondérale des tibias cultivés sur le milieu 60 + p-ab est-elle toujours subordonnée à la présence du p-ab ? L'expérience répond à cette question en confirmant le rôle catalytique du p-ab (fig. 17). 16 tibias, cultivés sur milieu 60 + p-ab, s'allongent de 20 % et

augmentent leur poids de 21 %. Les 16 tibias controlatéraux, explantés sur milieu 60, accusent une augmentation linéaire de 9 % et une perte de poids de l'ordre de 5 %.

Au cours de ce travail, on remarquera que les pourcentages de croissance atteints par les tibias cultivés sur ce milieu de base, 60 + p-ab, varient d'une série expérimentale à l'autre. Les milieux ont toujours été préparés de la même manière, avec des ingrédients de même provenance; cette différence, parfois très notable, ne peut être imputée qu'à des facteurs incontrôlables, tels que saison, mues des poules et vitalité des œufs. Nous y reviendrons dans un chapitre ultérieur.

B. — ESSAIS D'AMÉLIORATION DU MILIEU DE BASE 60 + P-AB

1. — *Par réduction du nombre d'acides aminés.*

Nous nous proposons d'éliminer du milieu de base les acides aminés non essentiels ou nuisibles à la croissance du tibia et d'aboutir ainsi à un milieu minimum spécifique, adapté à la nutrition de cet organe. Pour ces expériences, les pourcentages de survie et la croissance linéaire des tibias sont déterminés au bout de 5 jours de culture.

Le tableau XI groupe les résultats de 13 séries expérimentales. Dans chacune d'elles les tibias sont explantés sur le milieu à éprouver, les autres sur le milieu témoin 60 + p-ab. Tous les milieux contiennent l'acide para-aminobenzoïque.

La scission de la solution 60 en 2 fois 3 acides aminés a été guidée par les résultats de K. HAFKEN et EM. WOLFF (1953), qui montrent qu'un milieu composé de deux acides aminés sulfhydrylés (cystéine et méthionine) et d'arginine permet la survie et la différenciation des gonades et de la syrinx en culture. Pour le tibia cartilagineux, cette association permet une croissance linéaire voisine de celle observée sur le milieu témoin 60 + p-ab. Cependant, la survie des organes y est nettement inférieure.

De plus, ce milieu (à base d'arginine, de cystéine, de méthionine et d'acide para-aminobenzoïque) est moins bon que celui contenant l'acide glutamique, la lysine, l'histidine et l'acide para-aminobenzoïque, tant pour la survie que pour la croissance linéaire des tibias ($P < 0,01$) (ACM + p-ab: 22 %; GLH + p-ab : 30 %).

a) *Etude de ACM.* — L'adjonction d'un ou de deux des acides aminés du groupe GLH permet-elle d'améliorer le milieu ACM + p-ab et de retrouver la valeur nutritive du milieu 60 + p-ab ? L'addition d'acide glutamique seul améliore très nettement la survie des explants; en association avec la lysine ou avec l'histidine, l'acide glutamique permet une amélioration de la survie et augmente la croissance linéaire (pour ACM-ACMLG : $0,02 < P < 0,05$; pour ACM-ACMGH : $0,02 < P < 0,05$).

TABLEAU XI
INFLUENCE SUR LA SURVIE ET LA CROISSANCE DES TIBIAS
DE LA SUPPRESSION D'UN OU PLUSIEURS ACIDES AMINÉS DU MILIEU 60 + P-AB

Acides aminés entrant dans la composition du milieu	Milieu éprouvé			Milieu 60 + p-ab témoin			Croissance linéaire relative C_6	Valeur de « P »
	Nombre de tibia explantés	Nombre de tibia nécrosés ou en voie de nécrose après 5 jours de culture	Croissance linéaire après 5 jours de culture %	Nombre de tibia explantés	Nombre de tibia nécrosés ou en voie de nécrose après 5 jours de culture	Croissance linéaire après 5 jours de culture C_6		
ACM	10	8 sur 10	22	10	3 sur 10	27	-19	0,2 P < 0,3
GLH	11	3 sur 11	30	10	3 sur 10	27	+11	0,2 P < 0,3
ACM G	11	1 sur 11	24	10	3 sur 10	27	-11	0,4 P < 0,5
ACM L	11	5 sur 11	15	10	3 sur 10	27	-44	0,4 P < 0,01
ACM H	11	5 sur 11	18	10	3 sur 10	27	-33	0,01 P < 0,02
ACM LH	25	22 sur 25	12	24	4 sur 24	23	-48	0,01 P < 0,01
ACM LG	25	2 sur 25	28	24	4 sur 24	23	+22	0,01 P < 0,01
ACM GH	76	11 sur 76	27	70	13 sur 70	23	+18	0,01 P < 0,02
GLH A	29	8 sur 29	35	29	6 sur 29	36	-3	
GLH AC	19	5 sur 19	34	29	6 sur 29	36	-6	P < 0,01
GLH AM	23	2 sur 23	50	29	6 sur 29	36	+39	0,4 P < 0,5
GLH MC	14	2 sur 14	19	14	1 sur 14	21	-10	
AMGH	11	1 sur 11	29	10	3 sur 10	15	+93	0,4 P < 0,01

A : arginine; C : cystéine; M : méthionine; G : acide glutamique; L : lysine; H : histidine.

Par contre, l'adjonction de la lysine ou de l'histidine, ou l'addition simultanée de ces deux acides aminés inhibe très nettement la croissance des tibias. La croissance linéaire sur ces milieux est inférieure à la croissance sur milieu ACM + p-ab, d'une part ($P < 0,01$), sur milieu 60 + p-ab, d'autre part.

Ces expériences démontrent :

1° Le rôle essentiel, sinon indispensable, de l'acide glutamique. En effet, nous avons vu que l'absence d'acide glutamique dans n'importe quelle association d'acides aminés entraîne la nécrose d'un grand nombre d'organes (fig. 18).

2° L'influence inhibitrice de l'association lysine-histidine. Il suffit d'éliminer l'un ou l'autre de ces deux acides aminés du milieu 60 + p-ab, car isolément ils sont nécessaires à côté de l'acide glutamique, pour obtenir un milieu qui soit supérieur au milieu 60 + p-ab. (ACMG < 11 % ; AGMGH > 18 % ; ACMGL > 22 % ; ACMLH < 48 % au milieu 60 + p-ab témoin).

b) *Etude de GLH.* — Nous avons ajouté l'arginine, la cystéine, la méthionine, soit isolément, soit par groupe de deux acides aminés au groupe GLH et nous comparons les résultats de quatre associations différentes à ceux notés sur le milieu 60 + p-ab témoin de ces séries expérimentales. Nous avons été étonné de voir que la suppression totale de la cystéine du milieu 60 + p-ab (GLHAM + p-ab) provoque une amélioration très importante du milieu. Dans un paragraphe ultérieur nous reviendrons sur ce résultat.

A l'aide des résultats obtenus avec ces diverses associations constituées de 3 à 5 acides aminés, nous avons pu aboutir à l'élaboration d'un milieu nutritif minimum spécialement approprié à la croissance du tibia cartilagineux. En effet, en conservant l'arginine, la méthionine, l'acide glutamique (acide aminé essentiel pour la croissance et indispensable pour la survie) à côté de l'histidine ou de la lysine et en éliminant la cystéine, on obtient un milieu minimum, le milieu 104 + p-ab qui, en maintenant le taux de survie du milieu 60 + p-ab, améliore très nettement la croissance des tibias cultivés sur le milieu de base 60 + p-ab. Ce milieu 104 + p-ab contient donc, outre l'acide para-amino-benzoïque, l'arginine, la méthionine, l'acide glutamique et l'histidine.

2. — *Par adjonction d'autres acides aminés.*

17 acides aminés et 1 tripeptide ont été étudiés : le tryptophane, la proline, l'acide aspartique, la sérine, la thréonine, la glycine, la tyrosine, la glutamine, l'alanine, la valine, la taurine, l'isoleucine, l'ornithine, l'asparagine, la phénylalanine, l'hydroxyproline, la leucine et le glutathion (1955). Certaines de ces substances ne figurent pas

dans le milieu C : ce sont la glutamine, dont FISCHER a mis en évidence le caractère important (1948), l'alanine et le glutathion.

Ces substances sont ajoutées, une à une, au milieu de référence 60 + p-ab. Pour la plupart, elles sont toxiques, lorsqu'elles sont utilisées aux concentrations de la solution C/10 (tableau XII). Leur emploi à des concentrations moindres permet de décider si elles augmentent ou amoindrissent la valeur nutritive du milieu 60 + p-ab.

La valeur de chaque milieu à éprouver est comparée à celle du milieu de base témoin de chaque série expérimentale selon les 3 tests suivants : croissance linéaire, augmentation pondérale, survie des explants après 5 jours de culture. Les tableaux XII et XIII consignent les valeurs numériques obtenues avec chaque milieu étudié. Seuls y figurent les chiffres correspondant à la concentration optimum de l'acide aminé ajouté au milieu de base 60 + p-ab.

La lecture des tableaux amène à classer les acides aminés en quatre catégories :

1° *Les très bons acides aminés*, qui améliorent deux des caractères employés comme critère :

- α) croissance linéaire et augmentation pondérale : sérine (thréonine);
- β) augmentation pondérale et survie : thréonine, hydroxyproline.

2° *Les bons acides aminés*, qui améliorent l'un des caractères employés comme critère :

- α) croissance linéaire : valine (taurine);
- β) augmentation pondérale : glycine, alanine, isoleucine, glutathion, ornithine;
- γ) survie : asparagine.

3° *Les acides aminés inactifs* : glutamine, taurine, phénylalanine, leucine, proline. Bien que la taurine n'agisse sur aucun des trois critères d'une manière significative, il faut noter que cet acide aminé a permis une meilleure croissance linéaire dans deux séries sur trois. Dans la troisième, le milieu additionné de taurine était nettement inférieur au milieu témoin, ce qui a réduit l'écart entre ces deux milieux.

4° *Les acides aminés qui amoindrissent la valeur du milieu 60 + p-ab :*

- α) au point de vue augmentation pondérale et survie : tyrosine et tryptophane;
- β) au point de vue survie : acide aspartique.

La question se pose de savoir si l'action stimulatrice des 4 acides aminés sur la croissance linéaire (sérine, thréonine, taurine et valine) se manifeste également lors de leur adjonction à un milieu plus favorable que le milieu 60 + p-ab, le milieu 104 + p-ab, qui ne contient ni la cystéine, ni la lysine. En d'autres termes, ces 4 acides aminés ont-ils les mêmes propriétés stimulatrices en l'absence de la cystéine et de la

TABLEAU VII

INFLUENCE DE CERTAINS ACIDES AMINÉS, AJOUTÉS AU MILIEU 60 + p-AB,
SUR LA SURVIE DES TIBIAS

Acide aminé éprouvé	Concentration dans le milieu 6/10 en mg par 100 cm ³ de liquide de Tyrode	Concentration dans le milieu 118 en mg par 100 cm ³ de liquide de Tyrode	Nombre de tibias cultivés		Survie après 5 jours de culture				Appréciation de la valeur de l'acide aminé
			Sur le milieu 60 + p-ab additionné de l'acide aminé éprouvé	Sur le milieu 60 + p-ab témoin	Sur le milieu 60 + p-ab additionné de l'acide aminé éprouvé	Sur le milieu 60 + p-ab témoin	Valeur de « P »		
Sérine	5,0	2,0	20	20	4,7 jours	4,6 jours	0,6 < P < 0,7	==	
Thréonine	4,8	2,4	15	14	5	4,6	P < 0,01	+	
Glycine	1,0	1,0	15	14	4,8	4,6	0,3 < P < 0,4	==	
Tyrosine	0,4	0,2	15	14	3,5	4,6	P < 0,01	+	
Glutamine	—	0,16	15	14	4,7	4,6	0,4 < P < 0,5	==	
Alanine	—	0,28	19	22	4,3	4,4	0,6 < P < 0,7	==	
Valine	5,6	2,8	15	14	4,3	4,6	0,2 < P < 0,3	==	
Taurine	2,0	2,0	15	14	4,8	4,6	0,2 < P < 0,3	==	
Isoleucine	4,0	1,8	14	14	4,4	4,6	0,4 < P < 0,5	==	
Glutathion	—	0,016	24	23	4,7	4,7		==	
Ornithine	2,0	2,0	15	14	4,8	4,6	0,2 < P < 0,3	==	
Asparagine	2,0	2,0	14	14	5	4,6	P < 0,01	+	
Phénylalanine ...	2,8	1,2	14	14	4,8	4,6	0,2 < P < 0,3	+	
Hydroxyproline ..	1,0	1,0	14	14	5	4,6	P < 0,01	+	
Leucine	3,0	1,6	14	14	4	4,6	0,05 < P < 0,1	—	
Proline	2,04	2,04	22	22	4,3	4,4	0,7 < P < 0,8	—	
Tryptophane	2,0	2,0	22	22	3,7	4,4	0,02 < P < 0,05	—	
Acide aspartique..	2,36	2,36	22	22	3,1	4,4	P < 0,01	—	

TABLEAU XIII

INFLUENCE DE CERTAINS ACIDES AMINÉS, AJOUTÉS AU MILIEU 60 + P-AB,
SUR LA CROISSANCE LINÉAIRE ET PONDÉRALE DES TIBIAS

Acide aminé éprouvé	Nombre de tibias cultivés			Croissance linéaire après 5 jours de culture					Augmentation pondérale après 5 jours de culture				
	Sur le milieu 60 + p-ab additionné de l'acide aminé éprouvé	Sur le milieu 60 + p-ab témoin	Sur le milieu 60 + p-ab additionné de l'acide aminé éprouvé	%	Sur le milieu 60 + p-ab témoin	Relative par rapport au milieu 60 + p-ab	Valeur de « P »	Appréciation de la valeur de l'acide aminé éprouvé	Sur le milieu 60 + p-ab additionné de l'acide aminé éprouvé	%	Sur le milieu 60 + p-ab témoin	Relative par rapport au milieu 60 + p-ab	Valeur de « P »
Sérine	20	20	39	32	22	22	P < 0,01	+	18	11	64	0,02 < P < 0,05	+
Thréonine	15	14	42	36	17	17	P < 0,05	-	29	15	93	P < 0,01	+
Glycine	15	14	38	36	6	6	P < 0,7	-	29	15	93	P < 0,01	+
Tyrosine	15	14	36	32	13	13	P < 0,4	=	6	16	-63	P < 0,01	-
Glutamine	15	14	36	32	13	13	P < 0,3	=	16	16	0		=
Alanine	19	22	32	30	7	7	P < 0,4	=	19	14	36	P < 0,05	+
Valine	15	14	39	32	22	22	P < 0,05	+	13	16	-19	0,3 < P < 0,4	-
Taurine	15	14	36	32	13	13	P < 0,3	-	22	16	37	0,1 < P < 0,2	-
Isoleucine	14	14	32	36	-11	-11	P < 0,4	=	29	15	93	P < 0,01	+
Glutathion	24	23	38	38	0	0		=	24	14	71	P < 0,01	+
Ornithine	15	14	33	36	-8	-8	P < 0,6	=	28	15	87	P < 0,02	+
Asparagine	14	14	37	32	16	16	P < 0,3	=	20	16	25	0,5 < P < 0,6	=
Phénylalanine ..	14	14	36	36	0	0		=	19	15	27	P < 0,3	=
Hydroxyproline ..	14	14	40	36	11	11	P < 0,3	-	22	15	47	0,02 < P < 0,05	+
Leucine	14	14	32	32	3	3		=	15	16	-6		=
Proline	22	22	25	27	-7	-7		=	11	15	-21	0,7 < P < 0,8	-
Tryptophane	22	22	24	27	-11	-11	P < 0,6	=	4	14	-71	P < 0,01	-
Acide aspartique ..	22	22	23	27	-15	-15	P < 0,2	=	10	14	-29	0,3 < P < 0,4	=

lysine ? Pour répondre à cette question, nous avons explanté 37 tibias sur le milieu 104 + p-ab (arginine, méthionine, acide glutamique, histidine) additionné de taurine, de thréonine, de sérine ou de valine (tableau XIV). Les 37 tibias controlatéraux ont été explantés sur le milieu 60 + p-ab additionné du même acide aminé.

TABLEAU XIV

INFLUENCE DE CERTAINS ACIDES AMINÉS, AJOUTÉS AU MILIEU 104 + P-AB, SUR LA CROISSANCE LINÉAIRE DES TIBIAS

Acide aminé éprouvé	Nombre de paires de tibias cultivées	Croissance linéaire après 5 jours de culture	
		Sur milieu 104 + p-ab additionné de l'acide aminé à éprouver	Sur milieu 60 + p-ab additionné de l'acide aminé à éprouver
O	7	25 % $\pm$ 2,5 %	17 % $\pm$ 3 %
Sérine	8	33 % $\pm$ 2 %	32 % $\pm$ 2 %
Taurine	7	32 % $\pm$ 2 %	29 % $\pm$ 2,5 %
Thréonine	7	28 % $\pm$ 2,5 %	25 % $\pm$ 2,5 %
Valine	8	30 % $\pm$ 2 %	31 % $\pm$ 2 %

Les résultats consignés dans le tableau ci-dessus confirment :

— l'action favorable de la sérine, de la taurine, de la thréonine et de la valine sur la croissance linéaire;

— la supériorité du milieu 104 + p-ab sur le milieu 60 + p-ab ($0,01 < P < 0,02$).

D'autre part, ils montrent que la différence entre les milieux 104 + p-ab et 60 + p-ab est atténuée, voire inexistante, lorsqu'on leur ajoute l'un des 4 acides aminés. Donc, l'une de ces substances suffit à donner au milieu 60 + p-ab la même activité que le milieu 104 + p-ab.

Il faut noter que la diminution de la concentration de la sérine et de la thréonine s'est révélée particulièrement heureuse (tableau XII), car, employés à la concentration initiale (celle du milieu C/10), ces acides aminés étaient toxiques.

TABLEAU XV

COMPARAISON DES MILIEUX C/10 + P-AB ET 118 + P-AB

Milieu éprouvé	Nombre d'explants	Croissance linéaire après 5 jours de culture	Augmentation pondérale après 5 jours de culture
60 + p-ab	22	27 % $\pm$ 3 %	14 % $\pm$ 4,5 %
C/10 + p-ab	31	30 % $\pm$ 2,5 %	17 % $\pm$ 4 %
118 + p-ab	23	33 % $\pm$ 2,5 %	25 % $\pm$ 4,5 %

Il est intéressant de voir que la reconstitution du milieu C/10 + p-ab avec les acides aminés employés aux nouvelles concentrations et l'adjonction de glutamine, d'alanine et de glutathion (tableau XV) conduisent à un milieu, le milieu 118 + p-ab, qui permet, à côté d'une bonne croissance linéaire, une augmentation pondérale nettement supérieure à celle qu'on obtient sur le milieu C/10 + p-ab ($P < 0,01$).

On vient de voir qu'un certain nombre d'acides aminés, sans être indispensables, sont capables d'améliorer, dans une large mesure, la croissance linéaire, l'augmentation pondérale ou la survie des tibias cultivés sur milieu 60 + p-ab. Parmi ces acides aminés, la thréonine, l'asparagine et l'hydroxyproline sont communs aux gonades, à la syrinx et aux tibias (M. KIENY, K. STENGER-HAFFEN, EM. WOLFF, 1955); la sérine est favorable aux syrinx et aux tibias; la taurine améliore seulement la croissance du tibia.

C. — MISE EN ÉVIDENCE
DU RÔLE DES ACIDES AMINÉS SULFHYDRILÉS
SUR LA CROISSANCE DU TIBIA

ROSE (1938) a montré que l'adjonction de cystine à un régime entièrement dépourvu d'acides aminés soufrés n'arrête pas, chez le jeune Rat, la chute de poids, alors que la croissance reprend rapidement dès l'addition de méthionine. Il en est de même chez le Poulet, où la méthionine, et non la cystine, s'avère indispensable (GRAU et ALMQUIST, 1943).

Tetrahymena geleii (GENGHOF, 1951), comme le Rat et le Poulet, a un besoin impératif de méthionine, mais, lorsqu'on ajoute de la cystine au milieu, la concentration de la méthionine peut être diminuée (tout comme chez le Rat et le Poulet).

Dans la nutrition de l'organisme, il apparaît donc qu'en l'absence de méthionine, la cystine ne permet pas la croissance. Selon les auteurs, il n'en est pas de même dans les problèmes de nutrition de culture de tissus.

L'importance de la cystine a déjà été montrée par FISCHER et ses collaborateurs (1941 et 1949) sur des milieux semi-synthétiques. Ces auteurs ont signalé que la cystine était indispensable, mais non la méthionine. D'après KIELER (1954), la méthionine, au contraire, employée à des doses plus fortes, exerce une action stimulatrice très nette sur la croissance des fibroblastes d'embryons de Poulet, toujours en milieux semi-synthétiques. MORGAN et MORTON (1955), à l'aide de cultures en milieux chimiquement définis, montrent que les fibroblastes de cœur ont un besoin spécifique de cystine, qui ne peut être remplacée par la méthionine. Celle-ci est cependant nécessaire, en présence de la cystine, pour que l'on obtienne une survie optimum.

Ces recherches montrent que les besoins en composés sulfurés sont spécifiques et qu'ils diffèrent des exigences de l'animal adulte. Seuls, les résultats de KIELER se rapprochent de ceux qu'on obtient dans la nutrition des organismes.

Il est intéressant d'étudier le comportement d'un organe, le tibia, à l'égard de la cystéine et de la méthionine. Nous avons éprouvé l'efficacité de la cystéine, de la méthionine et du glutathion (1955), isolément ou en présence d'un petit nombre d'acides aminés, sur la survie et la croissance des tibias.

1. — *Survie.*

Explantés sur un milieu constitué de gélose, de liquide de Tyrode et d'acide para-aminobenzoïque (milieu T + p-ab), tous les tibias (14 cas) d'embryons de Poulet survivent jusqu'au 3^e jour de culture. A partir de ce moment les épiphyses de la majorité des tibias commencent à se nécroser. Certains d'entre eux peuvent survivre au-delà de cette limite, mais aucun n'atteint le 6^e jour de culture dans de bonnes conditions de survie.

Par contre, lorsqu'on ajoute à ce milieu un composé aminé sulfhydrylé, soit la cystéine, soit la méthionine, soit le glutathion, la survie de tous les tibias se poursuit jusqu'à la fin du 6^e jour de culture.

2. — *Croissance.*

152 tibias sont explantés, d'une part, sur un milieu (MB) qui contient de l'argine, de l'acide glutamique, de la lysine, de l'histidine et du p-ab, et qui est le milieu 60 + p-ab dépourvu de ses 2 acides aminés sulfurés, et, d'autre part, sur ce milieu MB additionné des 3 composés aminés sulfhydrylés séparément ou en groupe. La cystéine et la méthionine sont employées à la concentration du milieu 60 + p-ab, le glutathion à celle du milieu 118 + p-ab (tableau XII). Le milieu MB permet une croissance linéaire de 35 % (fig. 19 a). La méthionine et le glutathion, ajoutés séparément, sont seuls capables d'améliorer la croissance linéaire des tibias (MB + M = 50 % [$P < 0,01$]; MB + Glu = 49 % [$P < 0,01$]). La cystéine, par contre, ajoutée seule n'améliore pas le milieu de base (MB + C = 34 %); mais, en présence de méthionine (milieu 60 + p-ab) et de méthionine et de glutathion, elle empêche l'action favorisante de ces deux composés sulfurés (MB + C + M = 36 % [$P < 0,01$]; MB + C + M + Glu = 34 % [$P < 0,01$]) (voir fig. 19 a).

L'action des acides aminés sulfurés sur l'augmentation pondérale confirme ces résultats, tout en précisant le rôle défavorable de la cystéine.

En effet, celle-ci, ajoutée seule au milieu MB, abaisse la croissance pondérale de 17 % à 10 % ($0,02 < P < 0,05$). La méthionine, par contre, et surtout le glutathion, l'augmentent respectivement jusqu'à 29 % ($0,01 < P < 0,02$) et 42 %.

L'addition simultanée de cystéine et de méthionine, ou des 3 composés sulfhydrylés, permet une augmentation pondérale intermédiaire, qui est vraisemblablement la résultante des deux actions opposées de la cystéine d'une part, et de la méthionine et

*Action des composés sulfurés
sur la croissance des tibias*

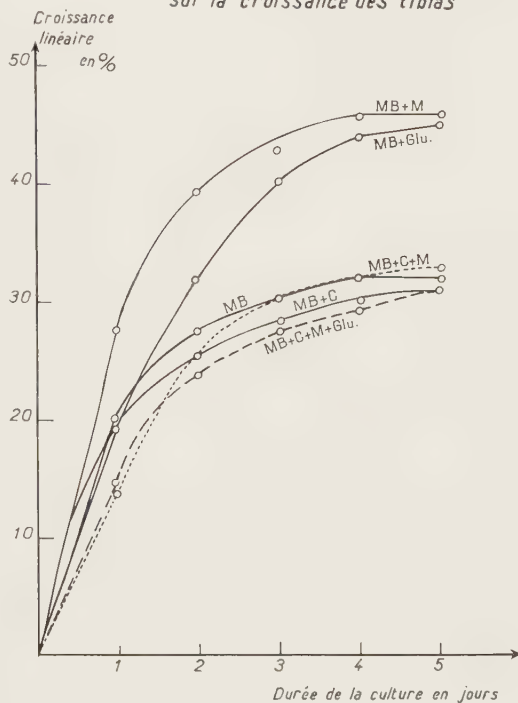


FIG. 19 a.

*Action des composés sulfurés
sur l'augmentation pondérale
des tibias*

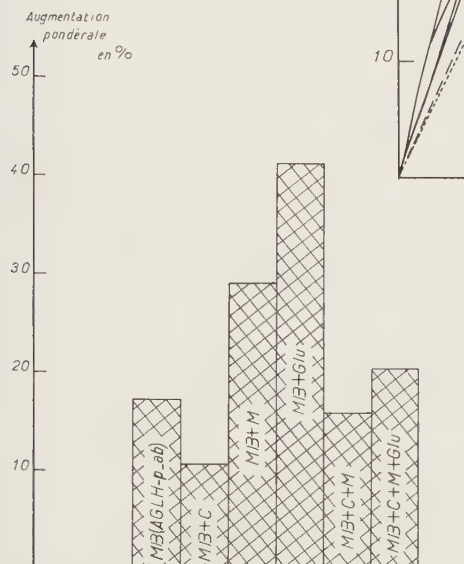


FIG. 19 b.

FIG. 19.

La cystéine, en présence d'arginine, d'acide glutamique, d'histidine, de lysine et d'acide para-amino-benzoïque, entrave la croissance linéaire (a) et l'augmentation pondérale (b) des tibias cultivés en milieux synthétiques pendant 5 jours.

A, arginine; G, acide glutamique; L, lysine; H, histidine; C, cystéine; M, méthionine; Glu, glutathion.

du glutathion, d'autre part (fig. 19 b). Néanmoins, le tableau XVI montre que l'action défavorable de la cystéine ne se révèle qu'en la présence des acides aminés du milieu MB.

La cystéine peut être utilisée par les tibias, car ceux que l'on explante sur un milieu ne contenant que de la cystéine et de l'acide para-amino-benzoïque s'allongent ($0,02 < P < 0,05$) et augmentent de poids ($P < 0,01$) davantage que sur le milieu T + p-ab. Mais ici encore la méthionine ($P < 0,01$ pour la croissance linéaire; $P < 0,01$ pour l'augmentation pondérale) et le glutathion sont plus favorables que la cystéine.

TABLEAU XVI

INFLUENCE DES COMPOSÉS SULFHYDRILÉS SUR LA CROISSANCE DES TIBIAS

	60 + p-ab témoin	Milieu T + p-ab	Cystéine + p-ab	Méthionine + p-ab	Glutathion + p-ab
Nombre de tibias..	14	14	14	14	10
Croissance linéaire.	$46\% \pm 3\%$	$20\% \pm 2,5\%$	$28\% \pm 2,5\%$	$36\% \pm 2,5\%$	$34\% \pm 2,5\%$
Augmentation pondérale	$34\% \pm 5\%$	$4\% \pm 4\%$	$+7\% \pm 4,5\%$	$+18\% \pm 5\%$	$+27\% \pm 5\%$

Ces résultats rejoignent ceux de K. HAFEN et EM. WOLFF (1953), qui montrent que la cystéine, seule source d'azote d'un milieu, est capable d'entretenir une survie prolongée et une certaine différenciation des gonades et des syrinx.

En conclusion, ces expériences montrent :

1° Que les composés aminés sulfhydrilés : cystéine, méthionine et glutathion, permettent de prolonger la survie jusqu'à la fin du 6^e jour de culture sans toutefois être indispensables; en effet, sur le milieu MB qui n'en contient pas, les tibias survivent aussi longtemps.

2° Que, malgré la très grande parenté chimique qui existe entre ces 3 composés sulfurés, leur rôle dans la croissance, tant linéaire que pondérale, est loin d'être comparable.

3° Que la cystéine peut être assimilée avec un certain profit quand elle est seule, mais entrave la croissance en présence d'autres acides aminés, tels que l'arginine, l'acide glutamique, la lysine et l'histidine.

Ce résultat diffère des résultats obtenus par K. HAFEN et EM. WOLFF (1953) en ce qui concerne la culture des gonades et des syrinx et pour lesquelles la cystéine s'est révélée indispensable. On peut penser que cette différence provient de ce que les gonades et les syrinx ont à effectuer, au stade du prélèvement, des différenciations histologiques importantes, alors que, dans nos expériences, les tibias, déjà différenciés en cartilage, ont surtout à effectuer des processus de croissance.

D. — CONCLUSIONS

Ces expériences, qui ont pris pour point de départ le milieu 60 + p-ab :

$$\boxed{\text{A C M G L H, p-ab}}^{(1)} \quad \text{ou} \quad \boxed{\begin{matrix} 60 \\ + \text{p-ab} \end{matrix}}$$

ont abouti à la constitution d'un milieu minimum pour la croissance du tibia, le milieu 104 + p-ab :

$$\boxed{\text{A M G H, p-ab}} \quad \text{ou} \quad \boxed{\begin{matrix} 104 \\ + \text{p-ab} \end{matrix}}$$

L'étude des besoins spécifiques des organes en culture a été conduite simultanément sur 3 organes différents : la syrinx (par EM. WOLFF, 1955-1957), les gonades (par K. STENGER-HAFFEN, 1955-1957) et le tibia.

Les milieux minimums pour la syrinx et les gonades se distinguent essentiellement de ceux qui ont été établis pour le tibia par l'absence d'acide para-aminobenzoïque.

Lors de l'élaboration des milieux minimums pour le tibia, nous avons mis en évidence, d'une part, l'existence d'une association d'acides aminés néfaste : celle de la lysine et de l'histidine; d'autre part, le caractère inhibiteur de la cystéine en présence d'arginine, de méthionine, de lysine, d'acide glutamique, d'histidine et d'acide para-aminobenzoïque.

Toutefois, il faut noter que la cystéine, comme d'ailleurs la méthionine et le glutathion, utilisée seule en solution dans le liquide de Tyrode est assimilée avec un certain profit. Ces 3 acides aminés favorisent la survie, la croissance linéaire et l'augmentation pondérale des tibias et constituent ainsi 3 milieux simples,

$$\boxed{\text{C, p-ab}} \quad \boxed{\text{M, p-ab}} \quad \boxed{\text{Glu, p-ab}}^{(2)}$$

qui, sans posséder les qualités des milieux 104 + p-ab et 60 + p-ab, méritent de figurer parmi les milieux convenant aux besoins nutritifs du tibia.

Le milieu 60 + p-ab a également servi de base aux essais d'amélioration de la croissance des tibias par l'addition d'autres acides aminés. Les milieux 60 + p-ab et 104 + p-ab peuvent être améliorés par l'adjonction d'un certain nombre d'acides aminés, ajoutés séparément à l'un de ces milieux. La thréonine, la valine, la taurine et la sérine améliorent la

(1) A = arginine ; C = cystéine ; M = méthionine ; G = acide glutamique ; L = lysine ; H = histidine ; p-ab = acide para-aminobenzoïque.

(2) Glu = glutathion.

croissance du diamètre transversal du premier anneau précartilagineux de la syrinx. La sérine, la valine, la glycine, l'isoleucine, l'ornithine et le glutathion sont favorables au développement des deux organes cartilagineux.

2. — *Acides aminés communs au développement des gonades et du tibia.*

Survie : aucun acide aminé n'est commun aux 2 organes.

Les acides aminés favorables à la différenciation des gonades (ornithine, thréonine, hydroxyproline et glycine) figurent parmi ceux qui stimulent soit la croissance linéaire, soit l'augmentation pondérale des tibias.

En définitive, les acides aminés qui entrent dans la composition des milieux spécifiques du développement des tibias peuvent se classer en plusieurs catégories :

Acides aminés indispensables : le seul acide aminé qui paraisse indispensable est l'acide glutamique. En effet, son absence, dans n'importe quelle association, provoque un fort pourcentage de nécrose, et son action sur la croissance linéaire des tibias est très importante. Les acides aminés sulfhydrylés, cystéine et méthionine, ne sont pas indispensables.

Acides aminés essentiels : l'arginine, l'histidine, la lysine, la méthionine. Ces acides aminés entrent dans la composition des deux milieux de base (104 + p-ab et 60 + p-ab).

Acides aminés favorables : ce sont tous les acides aminés, qui ajoutés séparément au milieu de base favorisent soit la survie, soit la croissance linéaire, soit l'augmentation pondérale : sérine, thréonine, hydroxyproline, valine, taurine, glycine, alanine, isoleucine, ornithine et asparagine.

Acides aminés défavorables : ceux qui, en synergie avec les acides aminés du milieu de base, exercent une action défavorable sur le développement des tibias : cystéine, tyrosine, tryptophane et acide aspartique.

En comparant cette classification avec celle donnée par ROSE (1938) sur les acides reconnus indispensables à la nutrition du jeune Rat, on remarque que les acides aminés essentiels à la croissance du tibia en milieux synthétiques sont des acides aminés indispensables à la croissance du jeune Rat. Parmi les acides aminés favorables, trois d'entre eux

figurent également parmi ceux qui sont indispensables pour le Rat (thréonine, isoleucine, valine). La glycine, bien que facultative dans la nutrition du jeune Rat, a été reconnue essentielle pour la croissance du Poulet (ALMQUIST et GRAU, 1943); elle est particulièrement propice à l'augmentation pondérale des tibias cartilagineux.

V. — ACTION DES HYDRATES DE CARBONE SUR LA CROISSANCE DU TIBIA CARTILAGINEUX EN MILIEUX SYNTHÉTIQUES ET NATURELS

D'après YOSHITOMI (1935), le glucose, le saccharose et faiblement l'acide lactique stimulent la croissance du fémur cartilagineux cultivé selon la méthode de FELL et ROBISON; le fructose et l'acide pyruvique n'ont aucune influence sur la croissance des os cartilagineux.

Ces expériences ont été réalisées sur des milieux naturels à base de substances protéiques contenant donc déjà du glucose. Il est intéressant de préciser, à l'aide de notre méthode de culture, les besoins en hydrates de carbone du tibia cartilagineux cultivé *in vitro* sur des milieux synthétiques qui ne contiennent ni protéines ni sucres.

A. — ETUDE DES HEXOSES

Les tibias, prélevés au 8^e jour d'incubation, sont maintenus en culture pendant 5-6 jours et mesurés quotidiennement.

1. — *Milieu ne contenant ni glucides ni acides aminés (milieu T₀).*

Les 8 tibias cultivés sur un milieu à base de gélose et de liquide de Tyrode dépourvu de tout hydrate de carbone (voir chapitre I) ne s'épithélisent pas et se nécrosent totalement en 24 heures de culture. Leur croissance est nulle.

2. — *Milieu contenant des glucides, mais dépourvu d'acides aminés, milieu T_(hexose).*

L'adjonction au milieu précédent de glucose à 2 ‰, qui est la concentration habituelle de nos milieux synthétiques (voir chapitre I), permet une croissance linéaire de 23 %. Le glucose est remplacé, tour à tour, par

le mannose, le galactose, le fructose et le sorbose à concentrations égales. L'action de chacun de ces hexoses est éprouvée sur 8 tibias (fig. 20). Seul le mannose est assimilé avec le même succès que le glucose. Sur le milieu contenant le sorbose, les bords du tibia s'effritent dès la 12^e heure de culture, l'épithélisation ne se fait pas, et la nécrose s'installe infailliblement. L'aspect rongé du tibia, qui ne se présente pas sur le milieu $T_{(0)}$, fait penser que le sorbose n'est pas seulement inutilisé, mais

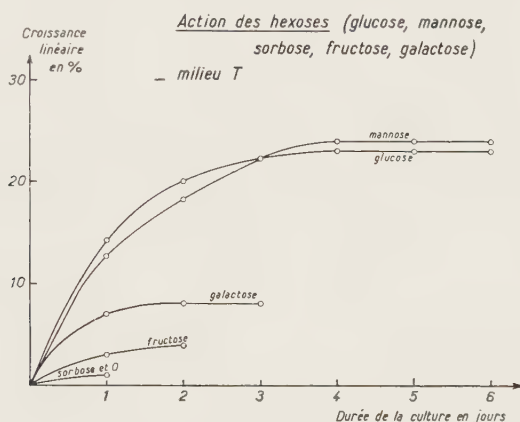


FIG. 20.

encore d'une certaine toxicité pour l'explant. Le galactose permet une meilleure survie que le fructose, mais, celle-ci ne dépasse, en aucun cas, 3 jours.

3. — Milieu contenant des acides aminés, mais dépourvu de glucides, milieu 60 + p-ab₍₀₎.

Pour étudier l'action des glucides en présence des acides aminés du milieu 60 + p-ab, nous nous sommes d'abord demandé si un milieu dépourvu de glucides, mais renfermant un mélange d'acides aminés et le p-ab, est capable d'entretenir la croissance des tibias. Autrement dit, les tibias sont-ils capables de se passer de glucides dès lors qu'on leur fournit des substances quaternaires ?

26 tibias cultivés sur milieu 60 + p-ab₍₀₎, se nécrosent tout aussi rapidement que ceux explantés sur milieu $T_{(0)}$. Donc, les glucides sont d'une importance primordiale pour la bonne marche d'une culture en milieux synthétiques. Ce résultat n'est pas surprenant, car on sait que le milieu de WHITE (1946), qui contient de nombreux ingrédients vitaminiques et autres, est impropre à la culture des tissus lorsqu'on lui soustrait le dextrose.

4. — Milieu contenant des glucides et des substances azotées,
milieu 60 + p-ab_(hexose).

Le milieu 60 + p-ab, contenant du glucose à 2 ‰, permet un allongement de 46 %. Des essais de remplacement du glucose par les 4 hexoses,

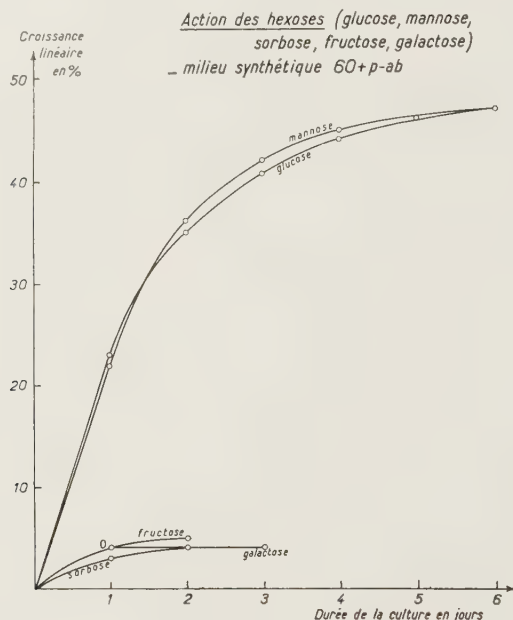


FIG. 21.

TABLEAU XVII

INFLUENCE DES HEXOSES
SUR LA CROISSANCE LINÉAIRE DES TIBIAS CULTIVÉS SUR MILIEU 60 + P-AB

Hexose éprouvé	Nombre de tibias explantés	Croissance linéaire après 6 jours de culture
Glucose	16	46 % $\pm$ 2,5 %
Mannose	16	46 % $\pm$ 2,5 %
Fructose	14	5 % $\pm$ 2,5 %
Galactose	14	4 % $\pm$ 2 %
Sorbose	14	3 % $\pm$ 2 %

toujours à la concentration de 2 ‰, ont donné des résultats analogues à ceux obtenus sur milieu T_(hexose) (tableau XVII).

Le galactose permet toujours une meilleure survie que le fructose. On retrouve l'action délétère du sorbose. L'équivalence du glucose et du mannose se confirme, mais leur supériorité par rapport aux autres hexoses

est fortement accentuée par la présence des acides aminés et du p-ab (fig. 22). L'écart, qui était de 15 % sur les milieux T, est porté à 37 % sur les milieux 60 + p-ab (comparer fig. 20 et 21).

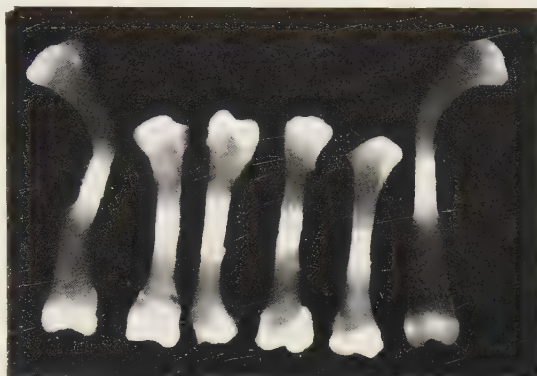


FIG. 22. — Action de différents hexoses sur la croissance de tibias d'embryon de Poulet de 7 1/2 jours, cultivés sur milieu 60 + p-ab contenant, de gauche à droite : du mannose, du galactose, du fructose, du sorbose, aucun glucide, du glucose. Il ressort très nettement que, parmi les hexoses, seul le mannose est capable de se substituer entièrement au glucose. Photographiés vivants. (Gr. : $\times 4,3$.)

5. — Influence de la concentration des hexoses sur la croissance des tibias.

a) *Milieux synthétiques.* — L'influence de la concentration des hexoses sur la croissance du tibia a été étudiée dans deux séries expérimentales.

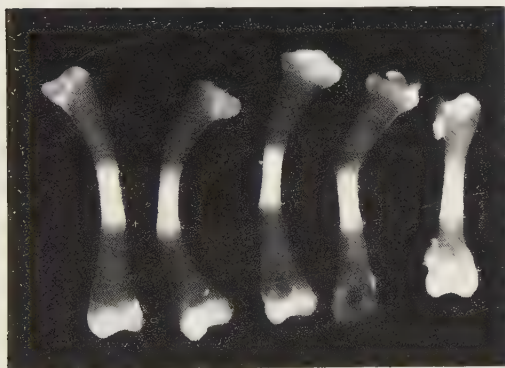


FIG. 23. — Influence de la concentration du glucose sur la croissance de tibias de 7 1/2 jours. Les tibias sont cultivés pendant 5 jours (en juillet) sur le milieu de base 60 + p-ab contenant le glucose aux concentrations suivantes (de gauche à droite) : 5 ‰; 2 ‰; 1 ‰; 0,2 ‰; sans

glucose. Croissance linéaire (de gauche à droite) : 4,7 à 7,3 mm; 4,6 à 7,1 mm; 4,6 à 7,1 mm; 4,8 à 6,7 mm; 4,7 à 5,0 mm. (Gr. : $\times 4,7$.)

La première, datant de juillet, est contemporaine de toutes les expériences décrites dans ce chapitre, la seconde date du mois de février de l'année suivante. Les résultats obtenus dans ces deux séries ne sont pas équi-

valents et traduisent une incidence de la saison sur les possibilités de croissance du tibia cartilagineux. Cette question sera traitée, en détail, dans un chapitre ultérieur.

La courbe de la figure 24 *a* indique que dès la concentration de 0,2 ‰, le glucose permet, en bonne période (juillet), un allongement de 33 % (fig. 23). En mauvaise période (février), par contre, cette concentration

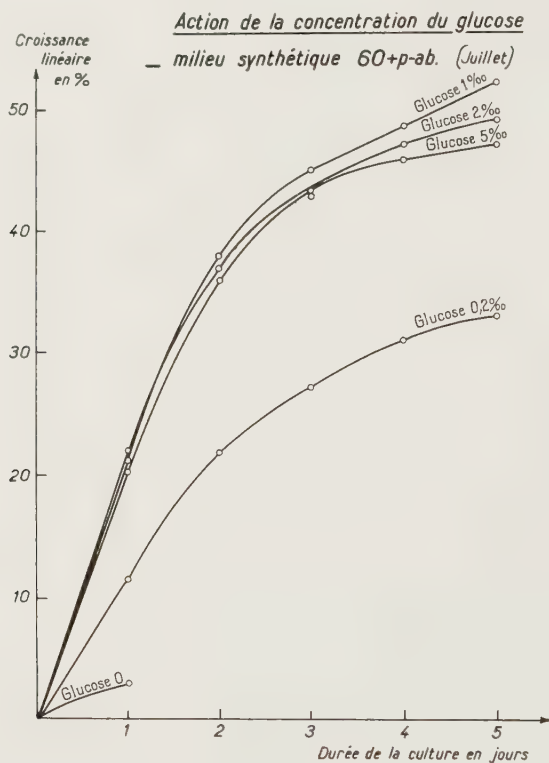


FIG. 24 *a*.

FIG. 24. — Influence de la concentration des hexoses sur la croissance des tibias suivant qu'ils sont explantés en été (*a*) ou en hiver (*b*) (voir p. 139).

est insuffisante pour permettre un allongement appréciable (5 ‰) (fig. 24 *b*). Il faut avoir recours, dans cette saison, à des concentrations bien supérieures pour obtenir des pourcentages de croissance qui restent pourtant au-dessous (25 ‰) de ceux que donnent, au cours de la saison d'été, les concentrations les plus faibles. Si l'on augmente encore les concentrations, en mauvaise période, dans l'espoir d'égaliser les chiffres de

la bonne saison, on atteint, avec une concentration comprise entre 10 et 20 ‰, le seuil de toxicité du glucose, sans pour autant dépasser une croissance de 25 %. Ces expériences montrent qu'en bonne période la concentration optimum du glucose pour la croissance du tibia cartilagineux en culture en milieux synthétiques se situe entre 1 et 5 ‰. La con-

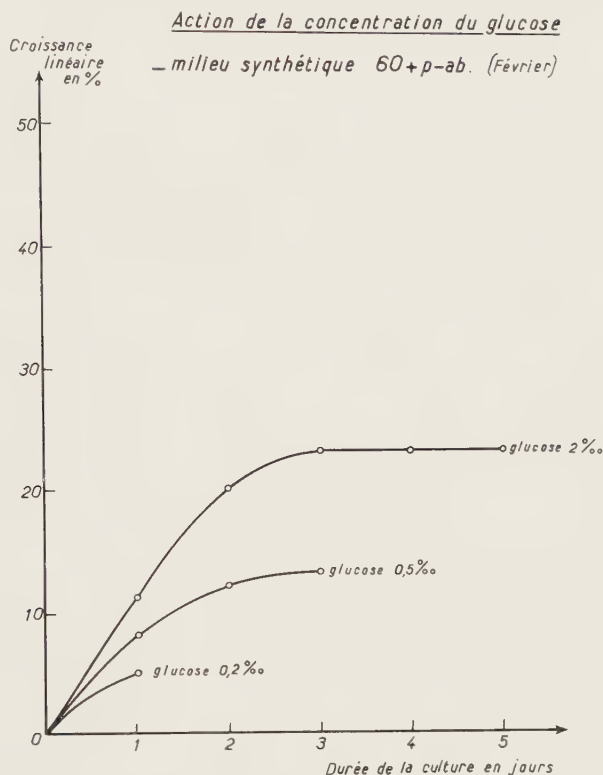


FIG. 24 b.

centration de 2 ‰, employée couramment dans la préparation des milieux synthétiques (voir chapitre I), est donc elle-même optimum.

C'est également cette concentration qui permet la meilleure croissance du tibia, en mauvaise période. Les mêmes expériences ont été reprises au mois de février, en remplaçant le glucose par le mannose, le galactose ou le fructose. Seul, le mannose donne les mêmes résultats que le glucose. Le galactose et le fructose ne permettent aucune croissance, quelle que soit la concentration utilisée.

En comparant la croissance des tibias cartilagineux cultivés en bonne période sur des milieux carencés ou appauvris en glucose, en la présence

ou en l'absence de substances azotées (tableau XVIII), on peut tirer les conclusions suivantes :

L'absence totale de glucose est incompatible avec la croissance des tibias cartilagineux, aussi bien sur le milieu T_(o) que sur celui contenant 6 acides aminés et l'acide para-aminobenzoïque. Ces expériences vérifient le rôle important des acides aminés et du p-ab sur la croissance, car non seulement ils sont capables de lever le préjudice causé par la réduction du glucose (milieu 60 + p-ab_[glucose 0,2 ‰] et milieu T_[glucose 0,2 ‰]) mais ils permettent une meilleure croissance sur milieu 60 + p-ab_[glucose 0,2 ‰], appauvri en glucose que sur le milieu T riche en glucose. Cette corrélation acides aminés-glucose a déjà été signalée par PH. SENDEL (1955) sur la croissance du germe plumaire d'embryon de Poulet, cultivé selon la même méthode de milieux synthétiques.

TABLEAU XVIII

CROISSANCE DES TIBIAS SUR MILIEUX CARENCÉS OU APPAUVRIS EN GLUCOSE, EN LA PRÉSENCE OU EN L'ABSENCE DE SUBSTANCES AZOTÉES

	Milieu T glucose 2 ‰	Milieu T glucose 0,2 ‰	Milieu T _(o) sans glucose	Milieu 60 + p-ab glucose 2 ‰	Milieu 60 + p-ab glucose 0,2 ‰	Milieu 60 + p-ab _(o) sans glucose
Croissance linéaire. Nombre de tibias.	23% ± 2%	5% ± 2,5%	Nulle (0%)	47% ± 2,5%	33% ± 2,5%	Nulle (1%)
	8	8	8	40	8	26

b) *Milieu naturel standard.* — La concentration du glucose a-t-elle une influence sur la croissance du tibia cultivé sur milieu à base d'extrait embryonnaire ?

TABLEAU XIX

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DU GLUCOSE
SUR LA CROISSANCE DU TIBIA CULTIVÉ EN MILIEU STANDARD

Concentration du glucose en g/litre de Tyrode	Nombre de tibias	Croissance linéaire après 7-8 jours de culture
0	10	62 % ± 2,5 %
0,2	16	61 % ± 2,5 %
2	18	69 % ± 2 %
5	8	64 % ± 2,5 %
10	18	64 % ± 2,5 %
20	10	37 % ± 2,5 %

Le tableau XIX montre que la concentration du glucose peut varier de 0 à 10 ‰ sans entraîner de modification du taux moyen de croissance des

tibias. La concentration de 20 ‰ s'avère trop forte, provoque un fort pourcentage de nécrose dès le 4^e jour de culture et ne permet pas une croissance linéaire moyenne supérieure à 37 %.

La suppression du glucose des solutions physiologiques, qui entrent dans la composition du milieu standard, est sans influence sur la croissance des tibias. En effet, des dosages inédits, effectués au laboratoire, ont montré que l'extrait d'embryons de 9-12 jours contient du glucose à un taux voisin de 1 ‰. Dans ces conditions, le tibia ne peut être soumis à une carence en glucose.

B. — ETUDE DES PENTOSE

On remplace, dans le milieu 60 + p-ab, le glucose par les pentoses suivants : xylose, ribose, rhamnose, arabinose. Sur de tels milieux, les tibias (12 cas pour chaque pentose) ne peuvent être maintenus en vie plus de 24 heures. En effet, quelle que soit leur concentration dans les milieux, les pentoses restent parfaitement inactifs. Les tibias se comportent comme sur un milieu ne contenant aucun sucre.

C. — ETUDE DES DISACCHARIDES

Nous avons étudié l'influence du lactose, du maltose et du saccharose sur la croissance linéaire des tibias, en culture, en présence des 6 acides aminés du milieu 60 et du p-ab. 14 tibias sont explantés sur chaque catégorie de milieu. Les milieux 60 + p-ab glucosés et 60 + p-ab dépourvus de glucides, servent de témoins. Les 3 disaccharides sont employés à la concentration molaire équivalente à la concentration habituelle du glucose. Les tibias, après 5 jours de culture, s'allongent de 5 % en présence de maltose ou de saccharose, de 1 % en présence de lactose, tandis que le glucose du milieu témoin permet une croissance linéaire de 42 %. Bien que les 3 disaccharides ne favorisent pas la croissance linéaire, on peut noter certaines différences entre eux. En effet, en présence de maltose ou de saccharose, les tibias survivent pendant 60 heures de culture. Le lactose révèle des propriétés analogues à celles du sorbose et provoque une nécrose rapide des explants. Des variations de concentrations ne modifient pas ces résultats.

D. — ETUDE DE DIVERSES SUBSTANCES APPARENTÉES AUX SUCRES

L'acide lactique et l'acide pyruvique ou leurs sels de Na, employés à diverses concentrations, en l'absence de glucose et en la présence d'arginine, de méthionine, de cystéine, d'acide glutamique, de lysine, d'histidine et de p-ab, ne stimulent pas la croissance des tibias et ne permettent pas la

survie au-delà de 48 heures. YOSHITOMI (1935) en cultivant des fémurs selon la méthode de FELL et ROBISON note une action favorable de l'acide lactique sur la croissance des os cartilagineux. L'acide lactique dans notre milieu chimiquement défini ne stimule pas la croissance. On peut penser que cette différence est due à la présence d'extrait embryonnaire qui contient un appareil enzymatique permettant l'utilisation du composé.

Ni la glucosamine, malgré sa structure qui correspond à celle du d-glucose, ni le fructose-di-phosphate ne se sont révélés favorables à la croissance du tibia. Le fructose-di-phosphate est l'un des 5 composants à poids moléculaire faible les plus importants pour la croissance et la survie des fibroblastes (EHRENSWÄRD, FISCHER, STJERNHOLM, 1949).

E. — CONCLUSIONS

Il ressort de ces expériences qu'en bonne période (juillet) comme en mauvaise période (février), la concentration en glucose de 2 ‰ est optimum pour la croissance du tibia cartilagineux en culture en milieux synthétiques.

Des études de substitution du glucose par d'autres hydrates de carbone (4 hexoses, 4 pentoses, 3 disaccharides) ont montré que seul le mannose est capable de se substituer entièrement au glucose.

On note que le glucose est un aliment indispensable en milieux synthétiques, mais que son absence, en milieux naturels, n'entrave pas la croissance des tibias cartilagineux; des dosages inédits, effectués au laboratoire par M. HAAG, ont montré que l'extrait d'embryons de 9 à 12 jours contient du glucose à un taux voisin de 3 ‰.

L'absence totale du glucose en milieux synthétiques est incompatible avec la croissance des tibias cartilagineux, même lorsque le milieu de culture contient de l'arginine, de la cystéine, de la méthionine, de la lysine, de l'acide glutamique, de l'histidine et de l'acide para-amino-benzoïque. Ce résultat confirme le rôle nutritif des acides aminés et de l'acide para-aminobenzoïque uniquement lorsqu'ils sont en présence de glucose.

SPRATT (1949) et TROWELL (1955) montrent qu'en culture organo-typique en milieux synthétiques le glucose peut être remplacé efficacement par le mannose. Le fructose, dans certaines conditions, peut permettre la différenciation du jeune blastoderme de poulet, tandis qu'il n'est capable d'assurer ni la survie, ni la différenciation des ganglions lymphatiques en milieux synthétiques.

L'équivalence du glucose et du mannose et leur supériorité sur le fructose est également signalée en culture de tissu par WORZNIAK (1952) en milieux naturels et par HARRIS et KUTSKY (1953) en milieux naturels dialysés.

VI. — ÉTUDE DES FACTEURS DE CROISSANCE

A. — INFLUENCE DES VITAMINES
SUR LA CROISSANCE DES TIBIAS CARTILAGINEUX
CULTIVÉS EN MILIEUX SYNTHÉTIQUES

Dans les chapitres III et IV, nous avons montré l'action favorable de l'acide para-aminobenzoïque sur la croissance du tibia cartilagineux. Le p-ab a été ajouté au milieu 60 à raison d'environ 20 γ par milieu. Cette concentration est du même ordre de grandeur que celle des acides aminés du milieu 60 (cystéine : 3 γ /milieu; lysine : 30 γ /milieu).

L'acide para-aminobenzoïque, qui est une vitamine du groupe B, conserve-t-il son activité lorsqu'il est employé à une concentration vitaminique (environ 0,02 γ /milieu) ?

TABLEAU XX

ACTION DE L'ACIDE PARA-AMINOBENZOÏQUE EMPLOYÉ À DIVERSES CONCENTRATIONS

Concentration du p-ab	Nombre de tibias explantés	Croissance linéaire après 5 jours de culture	Augmentation pondérale après 5 jours de culture
20 γ /milieu.....	22	36 % $\pm$ 3 %	27 % $\pm$ 5 %
0,02 γ /milieu.....	22	34 % $\pm$ 3 %	28 % $\pm$ 5 %
Nulle	20	15 % $\pm$ 3 %	7 % $\pm$ 4,5 %

Le tableau XX résume les résultats d'une série expérimentale dans laquelle l'un des tibias d'une paire est explanté sur le milieu 60 contenant 0,02 γ de p-ab par milieu, l'autre sur le milieu 60 contenant 20 γ de p-ab par milieu. Les chiffres obtenus montrent que le tibia s'accommode avec le même profit de l'une ou de l'autre concentration.

1. — Essai de remplacement du p-ab par l'acide folique.

L'acide folique, dont la molécule contient de l'acide para-aminobenzoïque, peut-il remplacer le p-ab dans le milieu 60 + p-ab ? On compare la croissance des tibias controlatéraux explantés, d'une part sur 60 + p-ab, d'autre part sur 60 + AF. Les deux substances sont employées à la concentration de 0,02 γ /milieu. Ces expériences ont été réalisées au cours du mois de mai (tableau XXI).

TABLEAU XXI

COMPARAISON DES ACTIONS DE L'ACIDE PARA-AMINO BENZOÏQUE
ET DE L'ACIDE FOLIQUE SUR LA CROISSANCE DES TIBIAS

Milieu de culture	Nombre de tibias	Croissance linéaire après 5 jours	Augmentation pondérale après 5 jours
60 + p-ab	25	35 % $\pm$ 3 %	33 % $\pm$ 6 %
60 + AF	25	33 % $\pm$ 3 %	34 % $\pm$ 6 %
60 + p-ab + AF...	15	34 % $\pm$ 3 %	31 % $\pm$ 6 %
60	10	17 % $\pm$ 3 %	7 % $\pm$ 5 %

Le tibia cartilagineux s'accroît autant en présence d'acide folique qu'en présence d'acide para-aminobenzoïque (fig. 25). Les actions favorables de ces deux facteurs de croissance ne s'ajoutent pourtant pas.



FIG. 25.

Tibias d'un embryon de Poulet de 7 1/4 jours, cultivés pendant 5 jours, d'une part (à gauche) sur milieu 60 + acide para-aminobenzoïque, d'autre part (à droite) sur milieu 60 + acide folique. L'action de ces deux substances est identique. Photographiés vivants. (Gr. : $\times$ 7.)

L'association p-ab-acide folique n'est pas plus favorable que chacune de ces deux substances prise individuellement.

TROWELL (1955) signale que des ganglions lymphatiques sont incapables d'utiliser l'acide folique. L'un de ses dérivés, par contre, l'acide folinique (*Leuconostoc citrovorum factor*) est assimilable.

L'acide folique, que le tibia utilise avec profit, peut-il être remplacé par l'acide folinique ? (1). Dans une série expérimentale, réalisée au début du mois de mars, en mauvaise période (chapitre VII), nous comparons l'acide folinique et l'acide para-aminobenzoïque (tableau XXII). Les deux substances sont employées à raison de 0,02 γ par milieu.

(1) Nous sommes très reconnaissants aux Laboratoires Labaz de nous avoir procuré l'acide folinique.

TABLEAU XXII

COMPARAISON DES ACTIONS DE L'ACIDE PARA-AMINOBENZOÏQUE
ET DE L'ACIDE FOLINIQUE SUR LA CROISSANCE DES TIBIAS

	Nombre de paires de tibias explantées	Croissance linéaire après 5 jours	Augmentation pondérale après 5 jours
60 + p-ab	21	14 % $\pm$ 3 %	10 % $\pm$ 4,5 %
60 + acide foli- nique		32 % $\pm$ 2,5 %	30 % $\pm$ 5 %
60	4	4 % $\pm$ 3 %	—

L'acide folinique se révèle sensiblement plus favorable au développement des tibias que l'acide para-aminobenzoïque, en mauvaise période. Il reste à savoir si cette différence se maintient au cours de la bonne période (mai-juillet) (chapitre VII).

Le tibia peut donc tirer parti à la fois de l'acide folique et de l'acide folinique. Il est impossible, dans l'état actuel de nos recherches, de dire laquelle de ces deux substances est la plus active.

2. — Essais de remplacement du p-ab par d'autres vitamines.

Nous avons étudié systématiquement l'influence des 12 vitamines suivantes sur la croissance du tibia cartilagineux :

Ergocalciferol.	Pantothénate de Ca.
Vitamine A (acétate).	Acide ascorbique.
	Acide nicotinique.
Chlorhydrate de thiamine.	Amide de l'acide nicotinique (PP)
Adermine.	(+) biotine.
Méso-inositol.	Vitamine B ₁₂ .
Riboflavine.	

a) *Vitamines liposolubles.* — L'action de la vitamine D (ergocalciférol) sur le développement des tibias sera exposée dans le chapitre VII.

La vitamine A (acétate) a été ajoutée au milieu 60 + p-ab à 5 concentrations s'échelonnant entre 0,000 06 U. I. et 600 U. I. par 100 cm³ de solution de Tyrode. La concentration la plus élevée (600 U. I.), qui se rapproche de celles employées par FELL et MELLANBY (1952) (1 200-1 500 U. I. par 100 cm³ de plasma de poule), exerce une nette action inhibitrice sur la survie et la croissance linéaire. Cette dernière est de 23 % sur le milieu témoin 60 + p-ab, et de 8 % seulement sur le milieu additionné de vitamine A. A mesure que la concentration de vitamine diminue, l'action inhibitrice s'affaiblit et disparaît à la concentration la plus faible employée (0,000 06 U. I.).

En aucun cas, la vitamine A (acétate) n'exerce une action favorable sur le développement des tibias.

TABLEAU XXIII

ACTION DES VITAMINES SUR LA CROISSANCE LINÉAIRE ET PONDÉRALE DES TIBIAS

Vitamine éprouvée	Concentration en γ de la vitamine par 100 cm ³ de liquide de Tyrode	Nombre de paires de tibia explan- tées	Croissance linéaire après 5 jours			Appré- ciation de la valeur de la vitamine (1) — +	Augmentation pondérale après 5 jours			Appré- ciation de la valeur de la vitamine + — — —
			Sur milieu 60	Sur milieu 60 additionné d'une vitamine	Relative rapport au milieu 60 %		Sur milieu 60	Sur milieu 60 additionné d'une vitamine	Relative par rapport au milieu 60 %	
Vitamine B ₁₂	0,2	22	13	22	69	+	11	26	136	+
Acide ascorbique	0,2	11	17	23	35	+	15	20	33	+
Acide nicotinique	0,02	15	14	22	57	+	9	24	166	+
Vitamine PP	0,02	14	10	24	120	+	9	20	122	+
Riboflavine	2	10	18	30	66	+	12	20	66	+
Méso-inositol	0,002	19	16	21	31	+	10	21	90	+
Pantothénate de Ca	0,02	10	10	25	150	+	5	15	200	+
Thiamine	2	9	13	20	55	+	8	19	138	+
Adernine	0,002	11	10	18	80	+	9	21	133	+
Biotine	0,02	18	14	28	100	+	6	24	300	+
Acide para-aminobenzoïque..	2	18	15	32	113	+	8	30	274	+

(1) La valeur de la vitamine est appréciée selon le test de Student-Fisher. On inscrit = dans la colonne chaque fois que P est supérieur à 0,05.

(1) La valeur de la vitamine est appréciée selon le test de Student-Fisher. On inscrit = dans la colonne chaque fois que P est supérieur à 0,05.

b) *Vitamines hydrosolubles*. — Pour chacune des 10 vitamines hydrosolubles nous nous sommes posé trois questions auxquelles répondent trois séries expérimentales différentes :

1° La vitamine améliore-t-elle le milieu 60 ? Les tibias controlatéraux sont explantés, d'une part, sur le milieu 60, et, d'autre part, sur le milieu 60 + vitamine.

2° Quelles sont les vitamines capables de remplacer le p-ab ? Les tibias controlatéraux sont explantés, d'une part, sur le milieu 60 + p-ab, et, d'autre part, sur le milieu 60 + vitamine.

3° L'action favorable du p-ab peut-elle être renforcée par l'adjonction d'une autre vitamine ? Les tibias controlatéraux sont explantés, d'une part, sur le milieu 60 + p-ab, et, d'autre part, sur le milieu 60 + p-ab + vitamine.

Dans la 2° et la 3° série expérimentale, le p-ab est toujours employé à la dose vitaminique (0,02 γ /milieu).

1^{re} *série expérimentale*. — Toutes les vitamines améliorent plus ou moins le milieu 60, dépourvu de tout facteur de croissance (tableau XXIII). Les vitamines stimulent surtout l'augmentation pondérale des tibias, ce qui est dû à une meilleure survie des explants sur le milieu 60 additionné de la vitamine.

2° *série expérimentale*. — Bien que toutes les vitamines améliorent le milieu 60, il n'en est qu'une, la biotine, qui permette les mêmes taux de

TABLEAU XXIV

ESSAI DE REMPLACEMENT DE L'ACIDE PARA-AMINOBNZOÏQUE
PAR D'AUTRES VITAMINES

	Nb. de paires de tibias ex- plan- tées	Croissance linéaire après 5 jours				Augmentation pondérale après 5 jours			
		Sur 60 + p-ab en %	Sur 60 + vita- mine en %	Relative par rapport à 60 + p-ab en %	Appré- ciation de la valeur de la vitamine	Sur 60 + p-ab en %	Sur 60 + vita- mine en %	Relative par rapport à 60 + p-ab en %	Appré- ciation de la valeur de la vitamine
Vitamine B ₁₂	20	24	22	- 8	=	27	24	-11	—
Acide ascorbique..	11	38	22	-42	—	30	16	-47	—
Acide nicotinique..	15	30	25	-17	—	35	20	-43	—
Vitamine PP	15	27	23	-14	=	34	30	-12	—
Riboflavine	12	30	23	-23	—	29	18	-31	—
Méso-inositol	36	29	23	-21	—	29	20	-45	—
Pantothénate de Ca.	15	25	22	-12	=	26	17	-35	—
Thiamine	25	25	18	-28	—	26	22	-15	—
Adermine	12	26	23	-11	=	23	21	- 9	—
Biotine	17	24	24	0	=	25	25	0	—

croissance que le p-ab (tableau XXIV). Avec les vitamines B₁₂, PP et l'adermine, les résultats, quoique inférieurs, sont très proches de ceux qu'on obtient avec le p-ab. Les autres vitamines sont loin d'égaler le p-ab. L'acide ascorbique, protégé ou non par le glutathion, inhibe tout particulièrement la croissance des tibias, qui présentent une nécrose épiphysaire très accentuée.

3^e série expérimentale. — L'adjonction d'adermine ou de riboflavine au milieu 60 + p-ab stimule la croissance linéaire des tibias (+ 25 % [P < 0,01] pour la riboflavine; + 19 % [P = 0,02] pour l'adermine). Par contre, l'addition de vitamine B₁₂ ou d'acide ascorbique abaisse la valeur du milieu 60 + p-ab, tant pour la survie que pour les croissances linéaire et pondérale. Les autres vitamines n'exercent aucune influence sur le développement des tibias cultivés en présence de p-ab (tableau XXV).

TABLEAU XXV

ESSAI D'AMÉLIORATION DU MILIEU 60 + P-AB
PAR ADJONCTION D'AUTRES VITAMINES

	Nb. de paires de tibias explorées	Croissance linéaire après 5 jours				Augmentation pondérale après 5 jours			
		Sur 60 + p-ab en %	Sur 60 + p-ab + vitamine en %	Relative par rapport à 60 + p-ab en %	Appréciation de la valeur de la vitamine	Sur 60 + p-ab en %	Sur 60 + p-ab + vitamine en %	Relative par rapport à 60 + p-ab en %	Appréciation de la valeur de la vitamine
Vitamine B ₁₂	22	26	22	-15	—	33	25	-24	—
Acide ascorbique..	15	36	31	-14	—	35	30	-14	—
Acide nicotinique..	14	23	20	-13	—	23	23	0	—
Vitamine PP	15	28	28	0	—	29	29	0	—
Riboflavine	12	28	35	+25	+	27	30	+11	—
Méso-inositol	15	28	28	0	—	32	29	-9	—
Pantothénate de Ca.	13	30	31	+3	—	29	30	+3	—
Thiamine	12	27	26	-4	—	29	26	-10	—
Adermine	12	31	37	+19	+	34	34	0	—
Biotine	21	28	29	+4	—	27	25	-7	—

En définitive, ces trois séries expérimentales indiquent que les 10 vitamines hydrosolubles ajoutées individuellement au milieu 60 sont capables d'améliorer la survie et la croissance des tibias. La biotine et, à la rigueur, les vitamines B₁₂, PP et l'adermine, peuvent remplacer le p-ab dans le milieu 60 + p-ab. L'activité des autres vitamines est bien moindre que celle du p-ab. Enfin, seules les actions favorables de l'adermine et de la riboflavine s'ajoutent à celle du p-ab.

B. — ESSAI DE REMPLACEMENT DU P-AB
PAR D'AUTRES FACTEURS DE CROISSANCE

1. — *Etude de la cocarboxylase.*

A la suite de TROWELL (1955), qui montre l'influence stimulatrice de la cocarboxylase (pyrophosphate de thiamine) sur le développement des ganglions lymphatiques en milieux chimiquement définis, nous avons étudié l'action de cette substance sur le développement des tibias. La dose utilisée par TROWELL a été maintenue (2,4 mg pour 100 cm³ de liquide de Tyrode ou 24 γ /milieu).

La valeur de la cocarboxylase a été testée de la même manière que celle des vitamines hydrosolubles en trois séries expérimentales. Le p-ab est employé à la dose de 20 γ par milieu.

TABLEAU XXVI

COMPARAISON DES ACTIONS DE L'ACIDE PARA-AMINOBENZOÏQUE
ET DE LA COCARBOXYLASE SUR LA CROISSANCE DES TIBIAS

Comparaison des milieux	Nombre de paires de tibias explantées	Croissance linéaire après 5 jours	Augmentation pondérale après 5 jours
60	12	14 % $\pm$ 3 %	10 % $\pm$ 4,5 %
60 + cocarboxylase ..		30 % $\pm$ 2,5 %	27 % $\pm$ 5 %
60 + cocarboxylase ..	12	27 % $\pm$ 3 %	27 % $\pm$ 5 %
60 + p-ab		29 % $\pm$ 3 %	27 % $\pm$ 5 %
60 + p-ab + cocarbo- xylase	12	33 % $\pm$ 3 %	26 % $\pm$ 6 %
60 + p-ab		30 % $\pm$ 3 %	25 % $\pm$ 6 %

Le p-ab et la cocarboxylase exercent la même action favorable sur la croissance des tibias (tableau XXVI). Ici encore les deux actions stimulatrices ne s'additionnent pas.

2. — *Etude de la dicarnitine
et de la carnitine synthétiques.*

LIÉBECQ-HUTTER (1955-1956) a montré que la dicarnitine exerce une certaine action sur la croissance et l'index mitotique d'os cartilagineux d'embryon de Poulet. Mais comme cet auteur a fait toutes ses expla-

tations sur des milieux naturels, qui contiennent déjà de la dicarnitine (FRAENKEL, 1953), on peut faire quelques réserves sur la valeur de ses résultats, qui n'en restent pas moins indicatifs.

Nous nous proposons de préciser le rôle de la dicarnitine sur le tibia cartilagineux en culture en milieux synthétiques; ceux-ci évitent l'emploi d'extrait embryonnaire et permettent d'écarter toute objection.

Nous comparons l'activité de la dicarnitine et de la carnitine à celle de l'acide para-aminobenzoïque. Nous avons vu aux chapitres III et IV qu'un milieu synthétique, constitué uniquement d'acides aminés, ne permet qu'une croissance minime, due en grande partie à des phénomènes d'imbibition du tibia.

Les tibias sont prélevés au 8^e jour d'incubation. La dicarnitine ou la carnitine est ajoutée à la solution 60 aux concentrations suivantes : 7 μ M et 2 mM.

a) *Action de la dicarnitine racémique.* — Dans le tableau XXVII, nous comparons l'action de la dicarnitine (bicarnésine Labaz) à celle du p-ab.

TABLEAU XXVII

ACTION DE LA DICARNITINE SUR LA CROISSANCE DU TIBIA

Substances ajoutées au milieu 60	Concentration molaire de la substance ajoutée	Nombre de tibias explan- tés	Croissance linéaire après 5 jours de culture	Augmentation pondérale après 5 jours de culture
<i>1^{re} série exp.</i>				
Dicarnitine	7 μ M	37	30 % $\pm$ 3 %	30 % $\pm$ 5 %
Dicarnitine	2 mM	35	38 % $\pm$ 3 %	39 % $\pm$ 5 %
p-ab	0,14 mM	30	32 % $\pm$ 3 %	30 % $\pm$ 5 %
p-ab	—	24	20 % $\pm$ 3 %	13 % $\pm$ 6 %
<i>2^e série exp.</i>				
Dicarnitine	2 mM	18	38 % $\pm$ 3 %	40 % $\pm$ 5 %
Dicarnitine + p-ab.	2 mM — 0,14 mM	18	32 % $\pm$ 3 %	28 % $\pm$ 6 %
Dicarnitine	7 μ M	11	29 % $\pm$ 3 %	28 % $\pm$ 5 %
Dicarnitine + p-ab.	7 μ M — 0,14 mM	11	27 % $\pm$ 3 %	30 % $\pm$ 5 %

La dicarnitine à faible concentration remplace efficacement le p-ab. Elle en surpasse l'action à forte concentration ($P < 0,01$). Toutefois, les actions favorables de la dicarnitine et du p-ab ne s'ajoutent pas; on note même une certaine inhibition de la croissance des tibias, lorsqu'on utilise simultanément le p-ab et la dicarnitine à raison de 2 mM ($P < 0,01$). Cela peut être dû à une certaine toxicité des deux substances réunies.

L'aspect histologique du développement périostique des tibias cultivés en présence de dicarnitine est semblable à celui que l'on observe en présence de p-ab (fig. 26).

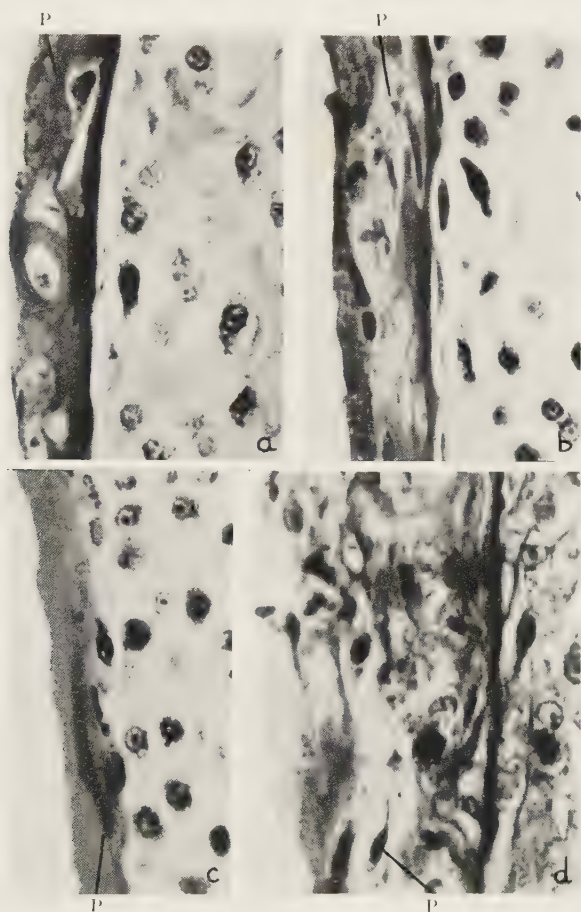


FIG. 26. — Périoste de tibias cartilagineux de 7 jours, cultivés pendant 7 jours sur milieux 60 + p-ab (a), 60 + dicarnitine (b) et sur milieux 60 (c), standard (d) témoins. Les coupes longitudinales ont été colorées selon la méthode trichromique de Masson. P, périoste. (Gr. : $\times 520$.)

b) *Action de la carnitine.* — On compare l'action de la carnitine à celle de la dicarnitine (tableau XXVIII). Cette étude a été faite aux concentrations 7 μ M et 2 mM sur 2 lots de 13 paires de tibias.

Employées à la même concentration molaire, la dicarnitine et la carnitine stimulent également la croissance des tibias cultivés en milieux

synthétiques. Nous retrouvons la supériorité de la concentration 2 mM sur celle de 7 μ M.

En définitive, la dicarnitine et la carnitine synthétiques, ajoutées au

TABLEAU XXVIII
COMPARAISON DES ACTIONS DE LA DICARNITINE
ET DE LA CARNITINE SYNTHÉTIQUES SUR LA CROISSANCE DU TIBIA

Substance ajoutée au milieu 60	Concentration molaire	Nombre de tibias explan- tés	Croissance linéaire après 5 jours de culture	Augmentation pondérale après 5 jours de culture
Dicarnitine	7 μ M	13	30 % $\pm$ 3 %	26 % $\pm$ 6 %
Carnitine	7 μ M	13	29 % $\pm$ 3 %	24 % $\pm$ 6 %
Dicarnitine	2 mM	13	36 % $\pm$ 3 %	32 % $\pm$ 6 %
Carnitine	2 mM	13	39 % $\pm$ 3 %	35 % $\pm$ 6 %

milieu 60, se sont révélées très favorables au développement *in vitro* des tibias cartilagineux. Leurs effets macroscopiques et microscopiques sont identiques à ceux que l'on obtient avec l'acide para-aminobenzoïque.

C. CONCLUSIONS

Les vitamines hydrosolubles (thiamine, adermine, méso-inositol, ribo-flavine, pantothénate de Ca, acide ascorbique, acide nicotinique, vitamine PP, biotine, vitamine B₁₂, acide folique), ajoutées séparément au milieu 60, améliorent la survie et la croissance des tibias. Toutefois ces vitamines, à l'exception de l'acide folique et de la biotine, n'ont pas le même effet sur la croissance que l'acide para-aminobenzoïque. Les actions favorables de ces vitamines et de l'acide para-aminobenzoïque ne s'ajoutent pas.

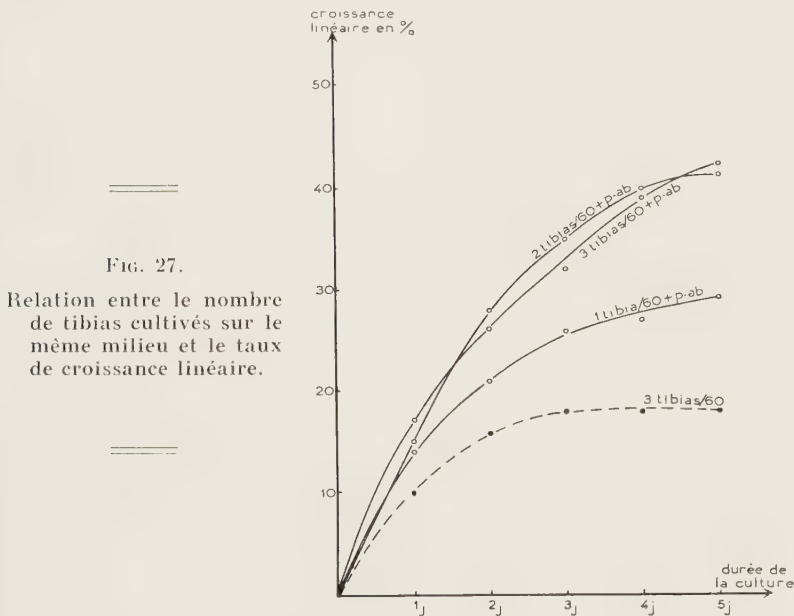
La vitamine A, ajoutée au milieu 60 + p-ab, n'exerce aucune action sur le développement des tibias, si ce n'est une inhibition, lorsqu'elle est employée à des doses supérieures à 0,000.000.6 U. I. par milieu.

La cocarboxylase, la dicarnitine et la carnitine sont, pour le tibia embryonnaire, des substances de croissance capables de remplacer l'acide para-aminobenzoïque. Toutefois, les effets favorables de l'une de ces substances et de l'acide para-aminobenzoïque ne s'ajoutent pas lorsqu'ils sont utilisés simultanément.

VII. — INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS
SUR LE DÉVELOPPEMENT DES TIBIAS
CULTIVÉS EN MILIEUX SYNTHÉTIQUES

A. — RELATION ENTRE L'ABAISSEMENT DU pH DU MILIEU
ET LE NOMBRE DE TIBIAS QUI SE DÉVELOPPENT SUR LE MILIEU

Au cours de ce travail, nous nous sommes aperçu qu'il n'était pas indifférent d'explanter 1, 2 ou 3 tibias dans la même salière de culture. En effet, le tibia explanté seul effectue une croissance linéaire moindre



que celui qui est cultivé en compagnie d'un ou de deux partenaires. Comme le montre le graphique (fig. 27, traits pleins), le tibia isolé s'allonge de 29 %, alors que les tibias explantés à 2 ou 3 s'allongent environ de 42 %.

RAY, SCHMIDT et MOSIMAN (1954) ont montré, en cultivant des fémurs congelés d'embryons de Rat, que toutes les fois que l'explant prolifère d'une manière appréciable *in vitro*, le milieu sur lequel il est cultivé voit son pH s'abaisser de 8,3-8,4 à 7,1-7,6.

Nous nous sommes donc demandé s'il existe un parallélisme entre le

nombre de tibias explantés dans la même salière et la chute du pH des milieux pendant la culture. Le pH d'un milieu portant 3 tibias s'abaisse-t-il plus que celui d'un milieu n'en portant qu'un seul ?

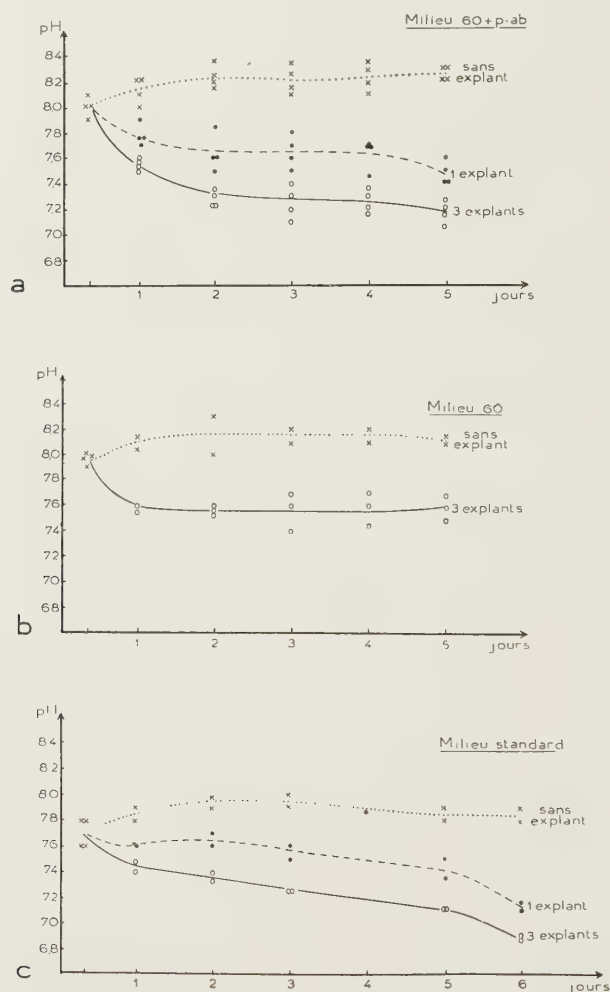


FIG. 28. — Evolution du pH des milieux 60 + p-ab (a), 60 (b) et standard (c) en fonction de la durée de la culture.

Pour répondre à cette question, nous avons préparé 84 milieux 60 + p-ab. 24 d'entre eux restent vides et servent de témoins sans explants. Les 60 milieux restants sont répartis en 3 lots de 20 milieux sur lesquels on explante respectivement 1, 2 ou 3 tibias par milieu. Tous les

tibias sont mis en incubation à 38° C. La première mesure du pH est faite sur 4 milieux vides après 6 heures d'incubation et fournit la valeur du pH de départ (7,9-8,1). Les mesures suivantes sont faites toutes les 24 heures sur 4 milieux prélevés dans chacun des lots. Les valeurs obtenues figurent dans le graphique (fig. 28 *a*). La courbe relative à la variation du pH des milieux portant 2 tibias se confond avec celle des milieux qui en contiennent 3 et n'est pas représentée dans le graphique.

Il apparaît nettement que la seule présence d'un explant vivant sur le milieu entraîne un abaissement notable du pH (8,2 à 7,5). En outre, cet abaissement se trouve accentué par l'explantation simultanée de 2 ou de 3 tibias (7,2). Il n'est pas impossible que cette chute progressive du pH, provoquée par la présence des tibias, soit un facteur favorable à la croissance du tibia. On peut penser que le tibia croît d'autant mieux que la chute du pH est plus rapide et que cette chute est facilitée par la culture simultanée de plusieurs tibias.

Nous avons refait les mêmes mesures du pH en utilisant le milieu 60 (sans p-ab) sur lequel sont explantés 3 tibias (fig. 28 *b*). Malgré l'absence d'acide para-aminobenzoïque, le pH initial est le même que celui du milieu 60 + p-ab. La courbe de croissance des tibias explantés dans cette série est portée dans le graphique 27 en ligne pointillée. Au bout de 3 jours, une grande partie des explants est en voie de nécrose. Le pH, après une chute rapide pendant les premières 24 heures de culture, reste stationnaire dès le 2^e jour. Ces expériences mettent en parallèle la nécrose des explants et l'état stationnaire du pH. Elles ne permettent pas de dire si les tibias, incapables d'abaisser le pH du milieu en l'absence de p-ab, se nécrosent parce que le pH reste trop élevé ou si, l'absence de p-ab entraînant la nécrose des explants, le pH reste stationnaire parce que les tibias sont morts.

Enfin, nous avons mesuré, dans les mêmes conditions, le pH du milieu standard (fig. 28 *c*). Les variations du pH de ce milieu sont en tous points comparables à celles du milieu 60 + p-ab.

Ces expériences mettent en évidence une relation entre le nombre de tibias qui se développent sur un milieu et l'abaissement du pH de ce milieu. La chute du pH du milieu semble en quelque sorte être une mesure de l'activité des explants qu'il nourrit.

B. — INFLUENCE DE LA SAISON SUR LA CROISSANCE DES TIBIAS CULTIVÉS EN MILIEUX SYNTHÉTIQUES

Nous avons constaté, au cours de ce travail, que le taux de croissance des tibias explantés sur le milieu 60 + p-ab n'est pas constant aux différentes époques de l'année. En gros, il est plus élevé en été qu'en hiver.

Nous avons groupé dans la figure 29 les taux de croissance de tous les tibias (612) explantés sur le milieu 60 + p-ab au cours de deux années de

recherches. Parmi ces 612 tibias, 356 ont été prélevés de décembre à février (période que nous appelons mauvaise) et ont montré une croissance de 0 à 45 %, de 18 % en moyenne (graphique supérieur); 256 ont été prélevés entre mai et juillet (bonne période) et se sont allongés de 5 à 69 %, de 37 % en moyenne (graphique inférieur).

L'existence d'un grand écart entre ces deux moyennes, 18 et 37 %, permet d'affirmer que les tibias prélevés pendant la mauvaise période ne sont pas capables d'assimiler les acides aminés du milieu 60 + p-ab

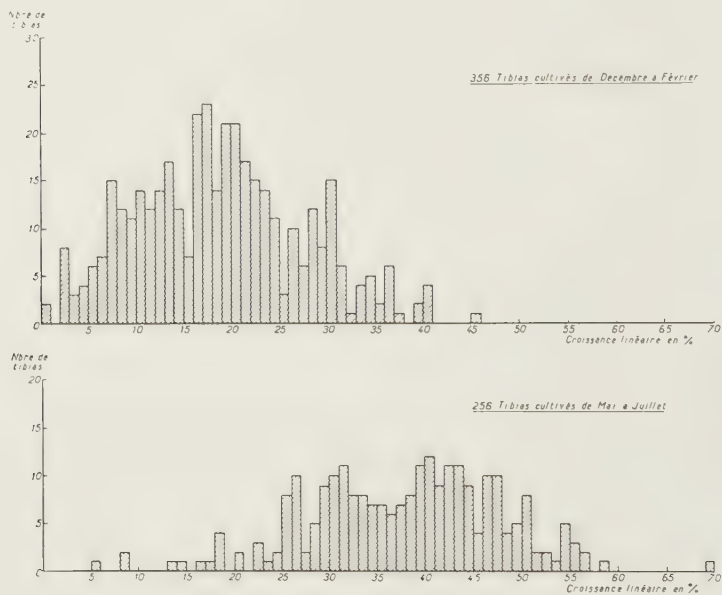


FIG. 29. — Histogramme des croissances linéaires obtenues en saison d'hiver (en haut) et en saison d'été (en bas).

avec le même profit que les tibias prélevés pendant la bonne période. Il est permis de penser que les tibias de la mauvaise période apportent en culture un bagage enzymatique ou vitaminique moins riche que celui des tibias de la bonne période.

Nous avons tenté de vérifier cette hypothèse en ce qui concerne la vitamine D, dont on connaît le rôle important dans l'édification du squelette.

Par ailleurs, on constate, même en mauvaise période, qu'un certain nombre de tibias s'accroissent presque autant que ceux de la bonne période (croissance linéaire ≥ 30 %), alors que d'autres se nécrosent très rapidement sans avoir amorcé leur épithélisation. Il existe donc, en mauvaise période, des différences individuelles qui portent sur le bagage enzymatique ou vitaminique que le tibia amène en culture. On peut

tenter d'améliorer la croissance des tibias les plus pauvres en répartissant équitablement à tous les tibias le contenu enzymatique ou vitaminique des tibias les plus riches. C'est ce qui est réalisé dans des expériences où l'on enrichit le milieu synthétique d'une faible quantité d'extrait de tibias cartilagineux.

1. — Action de la vitamine D.

Les expériences portent sur 26 paires de tibias. L'un des tibias est cultivé sur le milieu 60 + p-ab + vit. D (ergocalciférol), le partenaire controlatéral est explanté sur le milieu témoin 60 + p-ab. La vitamine D a été employée à raison de 0,000.008 U. I. environ par milieu.

TABLEAU XXIX

ACTION DE LA VITAMINE D SUR LA CROISSANCE DES TIBIAS CARTILAGINEUX

Date de l'explantation	Tibias cultivés sur 60 + p-ab + vitamine D		Tibias controlatéraux cultivés sur 60 + p-ab		Action positive (+) ou nulle (=) de la vitamine D
	Croissance linéaire après 5 jours de culture en %	Etat de l'explant après 5 jours de culture : TB — B AB — nécrosé	Croissance linéaire après 5 jours de culture en %	Etat de l'explant après 5 jours de culture : TB — B AB — nécrosé	
15-12.	27	AB	12	Nécrosé.	+
	8	AB	8	Nécrosé.	+
	24	B	8	Nécrosé.	+
	22	B	24	AB	+
18-12.	22	B	11	Nécrosé.	+
	29	B	27	B	=
	16	AB	24	B	=
	30	TB	6	Nécrosé.	+
	10	Nécrosé.	4	Nécrosé.	=
	7	Nécrosé.	7	Nécrosé.	=
	7	Nécrosé.	7	Nécrosé.	=
	8	Nécrosé.	6	Nécrosé.	=
	23	B	30	B	=
	28	B	26	B	=
	26	B	26	B	=
	24	B	24	B	=
	36	TB	7	Nécrosé.	+
	32	TB	5	Nécrosé.	+
5-1.	25	B	16	AB	+
	26	B	14	AB	+
	32	B	21	AB	+
	9	Nécrosé.	10	Nécrosé.	=
	15	B	17	AB	+
	11	Nécrosé.	10	Nécrosé.	=
	24	B	3	Nécrosé.	+
	26	B	4	Nécrosé.	+

TB : très bonne morphogénèse, bonne survie.
 B : bonne morphogénèse, bonne survie.
 AB : petites plages de nécrose au niveau des épiphyses.
 Nécrosé : nécrose épiphysaire ou nécrose totale.

Sur les 26 tibias explantés sur le milieu 60 + p-ab + vit. D, 14 ont été stimulés par la vitamine D. Parmi ces 14 tibias, 11 effectuent une meilleure croissance et une morphogenèse plus accentuée, 3 survivent plus longtemps que leurs témoins respectifs (tableau XXIX, fig. 30).

Les 12 tibias qui n'ont pas réagi à la vitamine D comprennent, d'une part, ceux dont les témoins sur 60 + p-ab effectuent d'emblée une bonne croissance ($\geq 24\%$), et, d'autre part, ceux qui, malgré la vitamine D, n'ont pas réussi à achever leur épithélisation dans les premières 24 heures de culture et se sont nécrosés rapidement.

Ces résultats mettent en évidence les différences individuelles des tibias de la mauvaise période, dont il a été question plus haut. Les tibias dont le bagage vitaminique est important n'ont que faire de l'apport de vitamine D; parmi les tibias, dont le bagage est mince, certains savent utiliser la vitamine D avec profit, mais d'autres sont plus déficients encore et ne peuvent tirer parti de la vitamine pour faire leur épithélisation.

En définitive, si la vitamine D permet d'améliorer la croissance d'un certain nombre de tibias de la mauvaise période, elle n'est pas suffisante pour effacer la différence entre les taux de croissance de la bonne et de la mauvaise période.

2. — Action d'un extrait de tibias.

S'il est vrai que les tibias déficients de la mauvaise période manquent de certains facteurs de croissance que contiennent d'autres tibias plus favorisés, il doit être possible d'améliorer la croissance des tibias déficients par l'adjonction au milieu 60 + p-ab d'un extrait de tibias. On fait ainsi profiter tous les tibias des richesses apportées par quelques-uns.

Préparation de l'extrait de tibias : les tibias d'embryons de 7, 10 ou 14 jours sont grossièrement découpés, puis broyés à l'aide d'un micro-broyeur. Après centrifugation, le liquide surnageant est dilué de moitié dans du liquide de Tyrode.

a) *Culture de tibias de 7 jours sur milieu contenant uniquement de l'extrait d'os cartilagineux comme source d'azote*. — L'extrait d'os cartilagineux a été éprouvé à deux concentrations différentes :

Milieu T + 0,02 cm ³ d'extrait de tibias		Milieu E T	
Gélose	9 parties.	Gélose	7 parties.
Liquide de Tyrode	6 parties.	Liquide de Tyrode	3 parties.
Extrait de tibias	0,02 cm ³ .	Extrait de tibias	3 parties.

L'évolution des tibias sur ces deux milieux a été comparée à celle des partenaires controlatéraux cultivés sur milieu T (tableau XXX). L'extrait de tibias, employé à la forte dose (milieu ET), favorise légèrement le développement des tibias. Mais les taux de croissance ainsi

obtenus restent cependant nettement inférieurs à ceux que l'on observe sur le milieu standard contenant de l'extrait d'embryons entiers. Ce résultat rejoint ceux de CROISILLE et DEMAL (1955), qui montrent que les extraits de foie et de cœur ne sont pas aussi efficaces que l'extrait d'embryons entiers.

L'extrait cartilagineux ou osseux est totalement inactif lorsqu'on l'emploie à la dose de $0,02 \text{ cm}^3$ par milieu.



FIG. 30.



FIG. 31.

FIG. 30. — Tibias d'un embryon de Poulet de 7 jours, cultivés pendant 5 jours sur milieu 60 + p-ab + vitamine D (à gauche), sur milieu 60 + p-ab (à droite). Le tibia de gauche a été photographié de profil, afin de mettre en évidence la coudure, signe de son allongement. Photographiés vivants. (Gr. : $\times 6,6$.)

FIG. 31. — Tibias d'un embryon de Poulet de 7 jours, cultivés pendant 5 jours, d'une part sur milieu 60 + p-ab (à gauche), d'autre part sur milieu 60 + p-ab additionné de $0,02 \text{ cm}^3$ d'extrait de tibias (à droite). L'action favorable de l'extrait de tibias est très nette. Photographie prise après fixation au liquide de Bouin. (Gr. : $\times 6,6$.)

b) *Culture de tibias de 7 jours sur milieu 60 + p-ab additionné d'extrait de tibias embryonnaires.* — L'extrait de tibias est ajouté au milieu 60 + p-ab à raison de $0,02 \text{ cm}^3$ par milieu. 34 tibias ont été soumis à l'action de l'extrait de tibias, tandis que les 34 tibias controlatéraux ont été cultivés sur le milieu 60 + p-ab témoin (tableau XXX).

Survie : la présence de l'extrait permet à tous les tibias de survivre jusqu'à la fin de la culture; 18 explants sont nécrosés sur le milieu témoin. (En bonne période, le pourcentage de nécrose est loin d'être aussi important et ne dépasse jamais 20 %.)

TABLEAU XXX

INFLUENCE D'UN EXTRAIT DE TIBIAS CARTILAGINEUX
SUR LA CROISSANCE DU TIBIA CULTIVÉ EN MILIEU SYNTHÉTIQUE

Explantations du 23 mars Milieux éprouvés	Nombre de paires de tibias	Croissance linéaire après 5 jours de culture	Proportion de survie après 5 jours de culture	Nombre de tibias qui réagissent à l'extrait de tibia
T	7	9	2 sur 7	6 sur 7
E T (extrait de tibias de 7 jours)...		17	6 sur 7	
T	8	11	1 sur 8	6 sur 8
E T (extrait de tibias de 14 jours)...		19	6 sur 8	
T	6	8	0 sur 6	0 sur 6
T + 0,02 cm ³ d'extrait de tibias de 7 jours		7	0 sur 6	
T	6	10	0 sur 6	0 sur 6
T + 0,02 cm ³ d'extrait de tibias de 14 jours		12	0 sur 6	
60 + p-ab	34	20	16 sur 34	27 sur 34
60 + p-ab + 0,02 cm ³ d'extrait de tibias de 7, 10 ou 14 jours.....		34	34 sur 34	
Standard (extrait total de 7 jours)...	6	50	10 sur 12	
Standard (extrait total de 14 jours)...	6	66	12 sur 12	

Morphogenèse : le broyat agit favorablement sur la morphogenèse de 25 tibias dont les épiphyses montrent un modelé plus prononcé que chez les partenaires.

Croissance : en moyenne, l'extrait de tibias augmente le taux de croissance linéaire de 20 % à 34 % ($P < 0,01$). 21 tibias s'accroissent dans des proportions importantes (fig. 31). 7 tibias, dont les témoins accusent une croissance linéaire supérieure à 30 % sur milieu 60 + p-ab, ne sont pas stimulés par l'extrait de tibias.

L'extrait de tibias apporte donc aux tibias déficients de la mauvaise période des facteurs, vraisemblablement de nature catalytique, qui leur permettent d'utiliser les acides aminés du milieu 60 + p-ab avec autant de profit que les tibias les plus favorisés. Sur ces derniers l'extrait n'a pas d'action.

Dans des expériences concomitantes, nous avons tenté d'améliorer la croissance des tibias en mauvaise période par l'emploi d'un milieu synthétique complexe, le milieu 199 de Parker (1950), qui nous avait déjà donné de bons résultats en bonne période (croissance linéaire : 48 %, augmentation pondérale : 40 % contre 32 % et 28 % sur 60 + p-ab). En mauvaise période, par contre, le milieu 199 de Parker n'est pas meilleur que le milieu 60 + p-ab.

C. — CONCLUSIONS

Des mesures quotidiennes du pH des milieux 60, 60 + p-ab et standard ont permis de mettre en évidence une relation entre le nombre de tibias (1, 2 ou 3) qui se développent sur un milieu et l'abaissement du pH de ce milieu pendant la culture. Cet abaissement du pH est accentué par l'explantation simultanée de deux ou de trois tibias. On peut penser que cette chute progressive du pH est un facteur favorable à la croissance du tibia.

Le comportement des tibias, *in vitro*, n'est pas constant aux différentes époques de l'année. Il existe une très grande différence de comportement entre les tibias prélevés pendant la bonne période (mai-juillet) et les tibias de la mauvaise période (décembre-mars). Ces derniers s'épithélisent mal ou pas du tout en culture, leur morphogenèse est minime, leur croissance restreinte.

Il est possible, par l'adjonction de vitamine D ou d'extrait de tibias, d'améliorer les résultats que l'on obtient pendant la mauvaise période.

L'adjonction de la vitamine D au milieu 60 + p-ab permet d'augmenter la durée de la survie et la croissance d'un certain nombre de tibias; d'autres, très déficients, ne peuvent pas tirer parti de la vitamine D pour effectuer leur épithélisation.

L'addition au milieu 60 + p-ab d'une faible quantité d'extrait de tibias de 7, 10 ou 14 jours permet à tous les tibias de survivre jusqu'au 6^e jour de culture. Elle porte le taux de croissance de 20 % à 34 %.

VIII. — CONCLUSIONS GÉNÉRALES

La méthode de culture d'organes mise au point par Et. WOLFF et K. HAFFEN permet d'étudier l'influence directe de nombreuses substances sur le développement du tibia cartilagineux, explanté en dehors de l'organisme dont il provient.

Au moment de son explantation, à 7 jours d'incubation, le tibia a déjà commencé à se différencier morphologiquement. Il continue *in vitro* sa croissance en longueur et en poids. Les processus morphogénétiques, qui accompagnent cette croissance, aboutissent à l'achèvement de son modèle.

Ce tibia cartilagineux se prête donc particulièrement à la recherche des besoins nutritifs minimums de la croissance *in vitro*. Un milieu chimiquement défini constitué d'une solution physiologique glucosée et d'acides aminés n'est capable d'assurer ni la survie prolongée ni la croissance des tibias. L'adjonction, à ce milieu, d'acide para-aminobenzoïque permet

au tibia de poursuivre son développement en milieu synthétique. Il semble que l'acide para-aminobenzoïque rende le tibia capable d'utiliser les acides aminés du milieu qui lui sont fournis et joue ainsi un rôle catalytique.

L'essai de nombreuses associations d'acides aminés a permis de définir les besoins spécifiques du tibia. L'acide glutamique paraît indispensable: son absence entraîne une mort rapide des explants, quelle que soit par ailleurs la composition du milieu synthétique. En outre, il stimule fortement la croissance linéaire. D'autres acides aminés, comme la méthionine, la lysine, l'histidine, se sont révélés très efficaces et sont capables d'ajouter leur action à celle de l'acide glutamique. Certains acides aminés, dont l'activité est moindre sans être négligeable, peuvent se substituer l'un à l'autre et être ajoutés indifféremment au milieu de base contenant arginine, méthionine, acide glutamique, histidine et p-ab; ce sont la sérine, la valine, la thréonine, la taurine.

D'autres acides aminés sont favorables lorsqu'ils sont ajoutés individuellement à un milieu synthétique, mais ne peuvent être employés simultanément sans entraîner une diminution de la croissance. Ainsi la lysine et l'histidine, prises isolément, sont capables d'assurer un bon développement, mais leur présence simultanée dans un milieu synthétique s'avère singulièrement défavorable à la croissance du tibia. De manière analogue, la cystéine peut être utilisée pour la survie et la croissance lorsqu'elle est employée seule; par contre, en la présence d'arginine, d'acide glutamique, de lysine et d'histidine, elle entrave la croissance linéaire et pondérale.

D'autres facteurs de croissance peuvent aussi remplacer l'acide para-aminobenzoïque. Ainsi l'acide folique, la biotine, la cocarboxylase, la carnitine ou la dicarnitine semblent capables de jouer le même rôle catalytique que le p-ab.

Le glucose est un aliment indispensable en milieux synthétiques. Son absence entraîne la nécrose totale des explants en l'espace de 24 heures. Le mannose est le seul hydrate de carbone à pouvoir se substituer au glucose.

La morphogenèse *in vitro* ne peut être séparée de la croissance. Ces deux processus sont étroitement liés et dépendants l'un de l'autre. Plus la croissance est importante, plus le modelé des condyles et des apophyses se rapproche de la morphologie normale. Il n'en est pas de même lorsque le tibia est prélevé précocement (6 jours) avant le début de sa différenciation histologique. Dans ce cas, il est incapable de franchir le seuil de sa différenciation, lorsqu'il est explanté sur les milieux synthétiques que nous avons définis ou même sur le milieu naturel standard. Il est alors nécessaire d'avoir recours au plasma de Poulet ou au sérum de Cheval, qui semblent contenir des facteurs spécifiques de la morphogenèse. D'une manière générale, sur les milieux naturels ou synthétiques,

la morphogenèse des tibias, lorsqu'elle a lieu (tibias de 7 jours), se fait conformément au développement normal. Les épiphyses se modèlent comme si elles s'articulaient avec les os voisins. Les protubérances et crêtes se façonnent en vertu des potentialités intrinsèques du tibia.

En aucun cas, les milieux synthétiques ne se sont révélés aussi efficaces que le milieu naturel standard. En milieu naturel, l'accroissement pondéral est accompagné d'une augmentation considérable de l'azote total. En milieux synthétiques, malgré une croissance linéaire et une augmentation pondérale importantes, le bilan azoté est stationnaire dans les cas les plus favorables. Le tibia n'en utilise pas moins les acides aminés du milieu synthétique. En effet, sur le milieu T dépourvu de tout aliment azoté, la perte d'azote considérable est vraisemblablement due à une désassimilation massive de l'explant. Il est permis de penser que, sur un milieu synthétique contenant des acides aminés et de l'acide para-aminobenzoïque, cette désassimilation est compensée en partie ou totalement par une assimilation concomitante. Il s'établit un équilibre assimilation-désassimilation qui se solde par une perte azotée faible ou nulle suivant le milieu éprouvé. Aucun milieu synthétique éprouvé jusqu'à ce jour n'est capable de faire pencher la balance en faveur de l'assimilation des substances azotées. Des expériences en milieux naturels constitués uniquement de liquide organique adulte (sérum de Cheval-plasma de Poulet) et des explantations en milieu standard à base d'extrait d'embryons de moins de 7 jours d'incubation ont montré qu'une croissance linéaire moyenne inférieure à 50 % n'est pas accompagnée d'un enrichissement en azote total. Or, la croissance linéaire sur milieu synthétique ne dépasse jamais ce taux. Il n'est donc pas étonnant que, dans la généralité des cas, le bilan azoté soit négatif sur les milieux synthétiques. On peut envisager que d'autres méthodes aboutiront à une assimilation mesurable des matières azotées, par exemple : l'utilisation de milieux synthétiques plus riches que ceux employés jusqu'ici, ou encore des repiquages répétés des tibias sur des milieux synthétiques dont on ferait varier la composition à mesure que l'explant progresse dans son développement. Cette étude des besoins optimums des tibias fera l'objet de travaux ultérieurs.

Enfin, nous avons mis en évidence une variation saisonnière du taux de croissance des tibias explantés sur un milieu synthétique donné. On note un optimum pendant les mois de printemps et un affaiblissement du taux de croissance pendant les mois d'hiver. On sait que le développement de l'embryon d'Oiseau dépend étroitement de l'alimentation des Poules et de l'époque de la ponte. Il n'est pas étonnant de constater qu'un tibia s'adapte d'autant plus facilement aux conditions inaccoutumées de la culture que l'embryon dont il provient est plus vigoureux. L'organe apporte avec lui un certain bagage nutritif et enzymatique dont il fait usage pendant toute la durée de la culture. Le capital

enzymatique ou vitaminique du tibia d'hiver semble plus mince que celui du tibia de printemps. Il ne nous a pas été possible d'identifier le ou les facteurs responsables de ces fluctuations saisonnières. Néanmoins, nous avons pu montrer que l'adjonction, en mauvaise période, d'une très faible quantité d'extrait de tibia cartilagineux à un milieu synthétique minimum efface totalement la différence entre les deux périodes. Sur un tel milieu, le tibia d'hiver se développe aussi bien qu'un tibia de printemps.

RÉSUMÉ

1. Les recherches sur les besoins nutritifs spécifiques du tibia cartilagineux en culture *in vitro* apportent une contribution à l'étude des besoins nutritifs des organes embryonnaires en général.

2. Lorsqu'elles sont explantées sur un milieu naturel contenant de l'extrait embryonnaire, à l'exclusion de tout autre aliment azoté (milieu standard de ET. WOLFF et K. HAFEN), les ébauches du tibia de l'embryon de Poulet de 7 jours s'allongent de 58 % en moyenne, augmentent leur poids en moyenne de 80 % et s'enrichissent en azote total de 55 à 91 %.

L'extrait d'embryons de 9-14 jours permet le meilleur développement des tibias de 7 jours. Les ébauches cartilagineuses plus jeunes, prélevées avant 6 jours, nécessitent, pour franchir le seuil de leur différenciation morphogénétique, la présence simultanée d'extrait embryonnaire et de plasma de Poulet.

3. Dans les milieux synthétiques, l'extrait embryonnaire est remplacé par un mélange de substances chimiques définies, telles que sels, sucre, acides aminés, vitamines.

Le remplacement de l'extrait embryonnaire par du liquide physiologique de Tyrode ne permet aucune croissance linéaire (3 %). Le poids du tibia diminue en moyenne de 10 %. La substitution à l'extrait embryonnaire d'une solution d'acides aminés contenant l'arginine, la cystéine, la méthionine, l'acide glutamique, la lysine, l'histidine, la proline, l'acide aspartique et le tryptophane ne permet qu'une faible croissance linéaire (11 %). Il semble que ce faible allongement soit dû principalement à des phénomènes d'imbibition. Les tibias n'augmentent pas de poids. L'adjonction d'acide para-aminobenzoïque à ce mélange d'acides aminés entraîne une croissance linéaire et pondérale importante, toutes les deux voisines de 30 %, mais n'augmente pas la teneur en azote total des tibias.

L'acide para-aminobenzoïque paraît être une substance très favorable, sinon indispensable, au développement des tibias embryonnaires. Il semble jouer le rôle d'un catalyseur qui rend l'explant capable d'utiliser les acides aminés du milieu.

L'addition simultanée, au milieu qui vient d'être décrit, d'autres acides aminés (phénylalanine, leucine, thréonine, valine, glycine, tyrosine, hydroxyproline, sérine, taurine, ornithine, asparagine) n'améliore pas le développement des tibias en culture.

4. La recherche d'un milieu synthétique minimum a abouti à l'élaboration d'un milieu contenant l'arginine, la méthionine, l'acide glutamique, l'histidine et l'acide para-aminobenzoïque. Au cours de ces expériences, les acides aminés ont pu être classés selon leur caractère indispensable, essentiel, favorable ou

inhibiteur. L'acide glutamique est le seul acide aminé qui paraisse *indispensable* à la survie prolongée (5 jours) des tibias. Tous les milieux synthétiques ne le contenant pas sont incapables d'assurer une survie des explants supérieure à 3 jours. Son action sur la croissance linéaire des tibias est importante. L'arginine, l'histidine, la lysine et la méthionine sont des acides aminés *essentiels* qui, sans être indispensables, permettent une croissance linéaire importante. Les acides aminés *favorables* sont ceux qui, ajoutés séparément au milieu minimum, favorisent la survie, la croissance linéaire ou l'augmentation pondérale; ce sont : la sérine, la thréonine, l'hydroxyproline, la valine, la taurine, la glycine, l'alanine, l'isoleucine, l'ornithine et l'asparagine. Certains acides aminés sont *défavorables*; en synergie avec les acides aminés du milieu minimum, ils exercent une action inhibitrice sur le développement des tibias. Ce sont la cystéine, la tyrosine, le tryptophane et l'acide aspartique.

5. L'absence de glucose des milieux synthétiques entraîne la nécrose totale des tibias en l'espace de 24 heures. Le glucose est un aliment indispensable en milieux synthétiques. Seul le mannose, parmi 11 hydrates de carbone étudiés (4 hexoses, 4 pentoses, 3 disaccharides), est capable de remplacer le glucose dans son action.

6. Une étude systématique de 12 vitamines (thiamine, adermine, méso-inositol, riboflavine, pantothénate de Ca, acide ascorbique, acide nicotinique, vitamine PP, biotine, vitamine B₁₂, acide folique et vitamine A) sur la croissance des tibias a montré :

1° que les 11 vitamines hydrosolubles ajoutées séparément au milieu contenant l'arginine, la cystéine, la méthionine, la lysine, l'acide glutamique et l'histidine améliorent la survie et les croissances linéaire et pondérale des tibias. Toutefois ces vitamines, à l'exception de l'acide folique et de la biotine, n'ont pas le même effet que le p-ab. Les actions de ces vitamines et de l'acide para-aminobenzoïque ne s'ajoutent pas, lorsque ces substances sont employées simultanément;

2° que la vitamine A n'exerce aucune action sur le développement des tibias, si ce n'est une action inhibitrice lorsqu'elle est employée à une dose supérieure à 0,000.000.6 U. I. par milieu.

La cocarboxylase, la dicarnitine (dichlorure du carnitate de carnitine) et la carnitine assurent le même développement des tibias que le p-ab. Les effets favorables de ces substances et du p-ab ne s'ajoutent pas lorsqu'on les utilise simultanément.

7. Mise en évidence d'un parallélisme entre l'abaissement du pH d'un milieu et le taux de croissance des tibias qui y évoluent. La croissance des tibias est d'autant plus importante que l'abaissement du pH est plus prononcé. Cet abaissement est faible et lent lorsqu'un seul tibia est explanté sur le milieu; il est plus grand et plus rapide avec 3 tibias cultivés sur le même milieu. En conséquence, 3 tibias explantés sur le même milieu s'accroissent mieux qu'un tibia isolé.

Des fluctuations saisonnières des taux de croissance des tibias explantés sur un même milieu synthétique ont été constatées. Les œufs pondus au printemps fournissent des embryons dont les tibias s'accroissent en moyenne de 37 %. Les tibias des embryons provenant d'œufs pondus de novembre à mars, au contraire, ne s'allongent en moyenne que de 18 %. L'adjonction, en mauvaise période (novembre-mars), d'une très faible quantité d'extrait de tibia cartilagineux au milieu synthétique, efface totalement cette différence. Sur un tel milieu, le tibia d'hiver se développe comme un tibia de printemps. La vitamine D, en mauvaise période, exerce un effet comparable à celui de l'extrait de tibia, mais d'une manière inconstante (50 % des tibias environ).

BIBLIOGRAPHIE

- ALMQUIST (H. J.) et GRAU (C. R.), 1944. — The amino-acid requirements of the chick. *J. Nutr.*, **28**, 321-325.
- BERGMANN (M.) et NIEMANN (C.), 1936. — On blood fibrine. A contribution to the problem of protein structure. *J. Biol. Chem.*, **115**, 77-85.
- CAMERON (G.), 1950. — Tissue culture technique. *Academic Press Pub. N. Y.*
- CARPENTER (E.), 1950. — Growth and form *in vitro* of avian femur rudiments on clots in which dried products are substituted for fresh fowl plasma. *J. exp. Zool.*, **113**, 301-309.
- CARPENTER (E.) et ROTHFELS (U. C.), 1947. — A comparison of growth and differentiation of avian femur rudiments on clots formed from embryo extract and plasma with those grown on clots of partially or completely known constituents. *Anat. Rec.*, **97**, 412-413.
- CHEN (J. N.), 1954. — The effect of insulin on embryonic limb-bones cultivated *in vitro*. *J. Physiol.*, **125**, 148-162.
- CROISILLE (Y.) et DEMAL (J.), 1955. — Culture de foie embryonnaire sur des milieux à base de divers extraits d'organes. *C. R. Soc. Biol.*, **149**, 1000-1003.
- EBERT (J. D.), 1952. — The development and the role of p-aminobenzoic acid in the early embryo. *Indiana Acad. Sci.*, **62**, 72-80.
- EHRENSWÄRD (G.), FISCHER (A.) et STJERNHOLM (R.), 1949. — Protein metabolism of tissue cells *in vitro*. The chemical nature of some obligate factors of tissue cell nutrition. *Acta Physiol. Scand.*, **18**, 218-228.
- EVANS (V. J.), BRYANT (J. C.), FIORAMONTI (M. C.), Mc QUILKIN (W. T.), SANFORD (K. K.) et EARLE (W. R.), 1956. — Studies of nutrient media for tissue cells *in vitro*. I. A protein-free chemically defined medium for cultivation of strain L. cells. *Canc. Res.*, **16**, 77-86.
- EVANS (V. J.), BRYANT (J. C.), Mc QUILKIN (W. T.), FIORAMONTI (M. C.), SANFORD (K. K.), WESTFALL (B. B.) et EARLE (W. R.), 1956. — Studies of nutrient media for tissue cells *in vitro*. II. On improved protein-free chemically defined medium for long term cultivation of strain L. 929 cells. *Canc. Res.*, **16**, 87-94.
- EVANS (V. J.), SHANNON (J. E.), BRYANT (J. C.), WALTZ (H. K.), EARLE (W. R.) et SANFORD (K. K.), 1953. — A quantitative study of the effect of certain chemically defined media on the proliferation *in vitro* of strain L. cells from mouse. *Nat. Cancer Inst. J.*, **13**, 773-781.
- FELL (H. B.), 1925. — The histogenesis of cartilage and bone in the long bones of the embryonic fowl. *J. Morph.*, **40**, 417-459.
- 1928. — Experiments on the differentiation *in vitro* of cartilage and bone. *Arch. exp. Zellf.*, **7**, 390-412.
- 1954. — The effect of hormones and vitamin A on organ cultures. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **58**, 1183-1187.
- FELL (H. B.) et MELLANBY (E.), 1952. — The effect of hypervitaminosis A on embryonic limb-bones cultivated *in vitro*. *J. Physiol.*, **116**, 320-349.
- FELL (H. B.) et ROBISON (R.), 1929. — The growth, development and phosphatase activity of embryonic avian femora and limb buds cultivated *in vitro*. *Biochem. J.*, **23**, 767-785.
- FISCHER (A.), 1941. — Die Bedeutung der Aminosäuren für die Gewebezellen *in vitro*. *Acta Physiol. Scand.*, **2**, 143-188.
- 1946. — Biology of tissue cells. *University Press, Cambridge*.
- 1948. — Amino acid metabolism of tissue cells *in vitro*. *J. Biochem.*, **43**, 491-497.
- FRAENKEL (G.), 1953. — Studies on the distribution of vitamin BT (carnitine). *Biol. Bull. Wood's Hole*, **104**, 359-371.
- GAILLARD (P. J.), 1949. — Germinal or covering epithelium. 3^e *Journ. cyto-embryol. belgo-néerland.*, 4-9.
- GENGHOF (D. S.), 1951. — The specificity of the sulfur amino acid requirement of *Tetrahymena gelii*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **34**, 112-120.

- GOOSSENS (R.), 1954. — Substitution de la pénicilline au jus embryonnaire dans les milieux, comme facteur de croissance des tissus en culture. *C. R. Soc. Biol.*, **148**, 891-894.
- GRAU (C. R.) et ALMQUIST (H. J.), 1943. — The utilization of the sulfur amino-acids by the chick. *J. Nutr.*, **26**, 631-640.
- HAFFEN (K.), 1953. — Résultats préliminaires sur le développement des gonades d'embryons de Poulet cultivées en milieux synthétiques. *C. R. Soc. Biol.*, **237**, 754-756.
- HAFFEN (K.) et WOLFF (EM.), 1953. — Sur les besoins nutritifs des gonades et de la syrinx des embryons d'Oiseaux en culture sur milieux synthétiques. *C. R. Acad. des Sc.*, **237**, 754-756.
- HAMBURGER (V.) et HAMILTON (H. L.), 1951. — A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.*, **88**, 49-92.
- HARRIS (M.) et KUTSKY (P. B.), 1953. — Utilization of added sugars by chick heart fibroblasts in dialysed media. *J. cell. comp. Phys.*, **42**, 449-469.
- HEALY (G. M.), FISHER (D. C.) et PARKER (R. C.), 1954. — Nutrition of animal cells in tissue culture. IX. Synthetic medium n° 703. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **32**, 327-337.
- HUXLEY (T. H.), 1873. — Handbuch der Anatomie der Wirbeltiere. *J. U. Kern's Verlag Breslau*.
- JENSEN (A. B.), 1948. — Animal tissue cells in protein-free media. *Nature G. B.*, **161**, 273.
- KIELER (J.), 1954 a. — The influence of amino acids on mitotic activity in fibroblast cultures. IV. Effect of methionine, cystine, tryptophane and proline. *Acta Path. Microb. Scand.*, **34**, 1-10.
- 1954 b. — The influence of amino acids on mitotic activity in fibroblast cultures. V. Relations among amino acids. *Acta Path. Microb. Scand.*, **34**, 11-18.
- KIENY (M.), 1953 a. — Sur l'explantation et la croissance du tibia cartilagineux de l'embryon de Poulet en milieux de culture naturels et synthétiques. *C. R. Soc. Biol.*, **147**, 868-872.
- 1953 b. — Action de l'acide para-aminobenzoïque sur la croissance du tibia cartilagineux d'embryon de Poulet en culture *in vitro*. *C. R. Acad. des Sc.*, **236**, 1920-1922.
- 1955 a. — Les besoins nutritifs spécifiques des tibias d'embryon de Poulet en culture *in vitro* sur milieux synthétiques. *C. R. Soc. Biol.*, **149**, 418-421.
- 1955 b. — Action des acides aminés sulfhydrilés sur la croissance du tibia cartilagineux cultivé en milieux synthétiques. *C. R. Soc. Biol.*, **149**, 1482-1485.
- 1956. — Action de la dicarnitine et de la carnitine synthétiques sur la croissance du tibia cartilagineux d'embryon de Poulet, cultivé en milieux synthétiques. *C. R. Acad. des Sc.*, **243**, 320-321.
- KIENY (M.), STENGER-HAFFEN (K.) et WOLFF (EM.), 1954. — Généralités sur les besoins nutritifs des cultures d'organes embryonnaires en milieux synthétiques. *C. R. Acad. des Sc.*, **239**, 1426-1427.
- LEPORI (N. G.), 1953. — Recherches sur la différenciation *in vitro* de la peau et du pigment chez l'embryon d'Oiseau. *Arch. Anat. microsc. et Morphol. exp.*, **42**, 194-208.
- LIÉBECQ-HUTTER (S.), 1955. — The effects of racemic « dicarnitine » on embryonic chick tibias and femurs *in vitro*. *Voeding*, **16**, 791.
- 1956. — Action de la dicarnitine sur la croissance et l'ossification d'ébauches de tibias et de fémurs d'embryons de Poulet cultivés *in vitro*. *J. Embr. exp. Morph.*, **4**, 279-298.
- MAXIMOV (A.), 1925. — Tissue cultures of young mammalian embryos. *Contr. Embr. Carneg. Inst. Wash.*, **16**, 49-113.
- MISZURSKI (B.), 1939. — Recherches sur l'influence des extraits des embryons de différent âge sur la croissance et la différenciation du cartilage et de l'os en culture. *Arch. exp. Zellf.*, **22**, 130-131.
- MORGAN (J. F.) et MORTON (H. J.), 1955. — Studies on the sulfur metabolism of tissues cultivated *in vitro*. I. A critical requirement for l-cystine. *J. biol. Chem.*, **215**, 539-545.

- MORGAN (J. F.), MORTON (H. J.), CAMPBELL (M. E.) et GUÉRIN (L. F.), 1956. — The nutrition of animal tissues cultivated *in vitro*. II. A comparison of various synthetic media. *J. Nat. Cancer. Inst.*, **16**, 1405-1415.
- MORGAN (J. F.), MORTON (H. J.) et PARKER (R. C.), 1950. — Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **73**, 1-8.
- MORTON (J. H.), MORGAN (J. F.) et PARKER (R. C.), 1950. — Nutrition of animal cells in tissue culture. II. Use of tweens in synthetic feeding mixtures. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **74**, 22-26.
- 1951. — Nutrition of animal cells in tissue culture. V. Effect of initial treatment of cultures in their survival in a synthetic medium. *J. cell. comp. Phys.*, **38**, 389-399.
- RAY (R. D.), SCHMIDT (J.) et MOSIMAN (R.), 1954. — Tissue culture studies of bone. *J. Bone Joint Surg.*, **36**, 1147-1165.
- ROSE (W. C.), 1938. — The nutritive significance of the amino acids. *Physiol. Rev.*, **18**, 109-136.
- SENGEL (Ph.), 1955 a. — Influence de la tyrosine sur la pigmentation de germes plumaires de la peau de l'embryon de Poulet cultivée *in vitro*. *C. R. Soc. Biol.*, **149**, 1479-1482.
- 1955 b. — Influence de certains acides aminés sur la croissance et la pigmentation du germe plumeux de la peau de l'embryon de Poulet cultivée sur milieux synthétiques. *C. R. Soc. Biol.*, **149**, 1032-1035.
- SPRATT (N. T.), 1949. — Nutritional requirements of the early chick embryo. I. The utilization of carbohydrate substrates. *J. exp. Zool.*, **110**, 273-298.
- STENGER-HAFFEN (K.), 1955. — Sur les besoins nutritifs spécifiques des gonades de l'embryon de Poulet cultivées en milieux synthétiques. *C. R. Acad. des Sc.*, **240**, 1018-1019.
- 1957. — Etude des besoins nutritifs des gonades embryonnaires d'Oiseau cultivées en milieux synthétiques. *Arch. Anat. microsc. et Morphol. exp.*, **46**, 521-607.
- TROWELL (O. A.), 1955. — The culture of lymph nodes in synthetic media. *Exp. Cell. Res.*, **9**, 258-276.
- VENDRELY (R.), 1947. — Sur la détermination de quantités d'azote purique de l'ordre de 10-40 gammas. Application aux acides nucléiques, nucléo-protéides, tissus, micro-organismes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1**, 95-100.
- WAYMOUTH (C.), 1951. — Tissue culture media. I. Approaches to development of synthetic media for the animal cell. A. Analytic and supplementation methods. In *Visscher M. B. ed. : Methods in medical research. Chicago. The year book publisher*, **4**, 201-206.
- WESTFALL (B. B.), PEPPERS (E. W.) et EARLE (W. R.), 1952. — A chromatographic investigation of the peptide and amino acid content of the protein-free ultrafiltrate from the serum and chick embryo extract. *Tissue Culture Association Abstr.*, **4**.
- WHITE (P. R.), 1946. — Cultivation of animal tissue *in vitro* in nutrients of precisely known constitution. *Growth*, **10**, 231-289.
- WILDE (C. E.), 1950. — Studies on the organogenesis *in vitro* of the urodele limb bud. *J. Morph.*, **86**, 73-103.
- WOLFF (Em.), 1953. — Croissance et différenciation en milieux synthétiques de la syrinx de l'embryon de Poulet. Résultats préliminaires. *C. R. Soc. Biol.*, **147**, 864-868.
- 1954. — Comparaison entre les valeurs nutritives de l'extrait d'embryon et de sérum dans la culture *in vitro* de la syrinx de l'embryon de Poulet. *C. R. Soc. Biol.*, **148**, 2078-2080.
- 1955. — Les besoins spécifiques en acides aminés de la syrinx de l'embryon de Poulet, cultivée *in vitro* sur un milieu entièrement synthétique. *C. R. Acad. des Sc.*, **240**, 1016-1017.
- 1957 a. — Nouvelles recherches sur la culture organotypique de la syrinx d'Oiseau. Culture sur différents milieux naturels et amélioration de ces milieux par des acides aminés. *Arch. Anat. microsc. et Morphol. exp.*, **46**, 1-38.

- 1957 *b.* — Analyse des besoins nutritifs d'un organe embryonnaire, la syrinx d'Oiseau, cultivée en milieu synthétique. *Arch. Anat. microsc. et Morphol. exp.* **46**, 407-468.
- WOLFF (Et.), 1952. — La culture d'organes embryonnaires *in vitro*. *Rev. Scient.*, n° 3317, 189-198.
- 1953. — Principe d'une méthode de culture d'organes embryonnaires en milieux synthétiques. *C. R. Soc. Biol.*, **147**, 857-861.
- WOLFF (Et.) et HAFFEN (K.), 1952. — Sur le développement et la différenciation sexuelle des gonades embryonnaires d'Oiseau en culture *in vitro*. *J. exp. Zool.*, **119**, 381-404.
- 1952. — Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires *in vitro*. *Tex. Rep. Biol. Med.*, **10**, 463-472.
- WOLFF (Et.), HAFFEN (K.), KIENY (M.) et WOLFF (Em.), 1953. — Essais de culture *in vitro* d'organes embryonnaires en milieux synthétiques. *J. Embr. exp. Morph.*, **1**, 55-84.
- WOLFF (Et.) et KIENY (M.), 1956. — Comparaison des valeurs nutritives de l'extrait embryonnaire et de liquides organiques adultes dans la culture *in vitro* de tibias cartilagineux d'embryon de Poulet. *C. R. Acad. des Sc.*, **243**, 2152-2154.
- WOLFF (Et.) et WOLFF (Em.), 1952. — Le déterminisme de la différenciation sexuelle de la syrinx du Canard cultivée *in vitro*. *Bull. Biol.*, **86**, 325-349.
- WORZNAK (J. J.), 1952. — Carbohydrate as sources of energy for growth in tissue culture. *Tissue Culture Association, Brown University, March 18 and 19, Providence, Rhode Island*.
- YOSHITOMI (M.), 1935. — Experimentelle Untersuchung über das Wachstum und die Verkalkung des Knochens (ausgeführt an Femuren von Hühnerembryonen durch Kulturen *in vitro*). *J. Biochem.*, **21**, 37-54.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

ÉTUDE DU FACTEUR « CREEPER » CHEZ LES OISEAUX

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 13 juin 1957.

*Le Doyen
de la Faculté des Sciences,*

J. PÉRÈS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

*Le Recteur
de l'Académie de Paris,*

JEAN SARRAILH.

Printed in France.